

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

BRISDOCID: <WQ 0031277A1 | >

(57)要約

配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18および20に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、これらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。さらに、BSSP4の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、BSSP4に対する抗体、該抗体を用いる検体中のBSSP4の検出方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	CW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YC	ユーゴスラビア
CL	チリ	JP	日本	NO	ノルウェー		南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

## 明 細 書

## 新規セリンプロテアーゼBSSP4

5 発明の分野

本発明は単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（本明細書において各々「hBSSP4」および「mBSSP4」と称し、両者を区別しない場合は単に「BSSP4」とする。）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体、変異体および多形性変種ならびにそれらの検出方法に関する。さらには、

10 hBSSP4およびmBSSP4タンパク質ならびにhBSSP4およびmBSSP4ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含む組成物、それらの製造方法および使用に関する。

発明の背景

15 プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。

20 各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパクは、まず、活性型タンパク質のN末端に通常15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に参与するペプチド（分泌シグナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に関連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を

25

持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体（プロ体）のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、このようなタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

- 5       例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

セリンプロテアーゼの至適pHは、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に30,000以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテ  
10       アーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより多くの新規プロテアーゼのcDNAおよびアミノ  
15       酸配列が決定されている。この方法により、Yamamuraら（Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997）、Gschwendら（Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997）、Chenら（Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995）およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

- 20       特開平9-149790号の配列番号3には新規セリンプロテアーゼであるニューロシン（Neurosin）が開示されており、また NeurosinはBiochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いてニューロシンを大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリー  
25       ニング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。

ニューロシンのように脳・神経系で発現されるセリンプロテアーゼは脳・神経系において種々の役割を果たしていると考えられる。従って、脳・神経系において発現されている新規プロテアーゼをコードする遺伝子の単離およびこの遺伝子を使用したタンパク質の生産は、脳・神経系に関連する各種疾患の診断および治



療に有用である可能性がある。例えば、脳においてはアルツハイマー病（AD）、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。

ADの臨床診断は今日、DSM-III-RおよびNINCDS-ADRDAの診断基準（McKhann, G. et al. ; Neurology, 34, 939, 1994）または、DSM-IVの診断基準（American Psychiatric Association ; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994）に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MRS検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からADの臨床診断に、より正確的な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、

1) AD治療薬の客観的な効果判定システム、2) ADの診断基準を満たす以前

の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、A $\beta$ およびその前駆体タンパク質である $\beta$ APP、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、Apo Eおよび他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担っていると考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は、癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-PA) がある。U-PAはタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素および

コラゲナーゼ等が知られている。

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等にご利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク (AFP) (Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988) および癌胎児性タンパク抗原 (CEA) は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン (hK2) は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2は前立腺特異的抗原 (PSA) の配列と78%の相同性を有しており、PSAも前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている (Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998、Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997、Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997、Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997)。

20

#### 発明の目的

ゆえに、本発明の主な目的は、脳、前立腺、胎盤および骨格筋等の各種組織において、アルツハイマー病 (AD)、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得る新規セリンプロテアーゼを提供することである。

25

#### 発明の要旨

この様な状況の中、我々はヒトおよびマウス新規セリンプロテアーゼをコード

する cDNA のクローニングに成功した。

本発明の一つの態様は生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼ hBSSP4 および mBSSP4 アミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

- 5       すなわち、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 268 に示す 268 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 1、塩基番号 151 ～ 954）である。また、本発明には、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列に 1 もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体（カルシウム付加体など）、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、またはタンパク質の二量体等が含まれる。
- 10
- 15

- さらに、配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～ 270 に示す 270 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 3、塩基番号 151 ～ 960）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。
- 20

- さらに、配列番号 6 のアミノ酸番号 1 ～ 257 に示す 257 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 5、塩基番号 151 ～ 921）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。
- 25

さらに、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 ～ 97 に示す 97 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 7、塩基番号 151 ～ 441）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのア

ミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号10のアミノ酸番号1～158に示す158個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号9、塩基番号151～624）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号12のアミノ酸番号1～82に示す82個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号11、塩基番号151～396）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号14のアミノ酸番号1～185に示す185個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号13、塩基番号151～705）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号16のアミノ酸番号1～80に示す80個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号15、塩基番号151～390）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号18のアミノ酸番号1～253に示す253個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号17、塩基番号151～909）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号2のアミノ酸番号49～116に示す34個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号4～105）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的

に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

さらに、配列番号2のアミノ酸番号-15~-1に示す15個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号10、6~150）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

また、配列番号20のアミノ酸番号1~259に示す259個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号27~1003）である。また、本発明には、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号20のアミノ酸番号-49~-16に示す34個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号80~181）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

さらに、配列番号20のアミノ酸番号-15~-1に示す15個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号182~226）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

本発明の別の態様は、配列番号2に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1~268）のN末端側に、配列番号2に示す-49から-1までの49個のアミノ酸もしくは-15から-1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸317個もしくは283個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号4~954もしくは塩基番号106~954）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのア

ミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

5 本発明の別の態様は、配列番号4に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1～270）のN末端側に、配列番号4に示す－49から－1までの49個のアミノ酸もしくは－15から－1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸319個もしくは285個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号4～960もしくは塩基番号106～960）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

10 本発明の別の態様は、配列番号6に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1～257）のN末端側に、配列番号6に示す－49から－1までの49個のアミノ酸もしくは－15から－1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸306個もしくは272個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号5、塩基番号4～921もしくは塩基番号106～921）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

20 本発明の別の態様は、配列番号20に示す成熟体mBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1～259）のN末端側に、配列番号20に示す－49から－1までの49個のアミノ酸もしくは－15から－1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸308個もしくは274個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号80～1003もしくは塩基番号182～1003）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。

25 さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

また本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19に示す塩基配列、ならびにこれらに類似する塩基配列にも関する。

以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各

G l y - P r oは有していなかった。配列番号17に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号720の下流に配列番号17の塩基番号721～948を付加したものであり、配列番号1の塩基番号721以降が除去されたものである。

5 配列番号20に示したアミノ酸配列はマウス型タンパク質(mBSSP4)であり、セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号1～259で示したポリペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すA l a - A l a - H i s - C y sおよびアミノ酸番号192～196に示すA s p - S e r - G l y - G l y - P r oを有し、かつ、それらのコンセンサス配列間にA s pが1カ所以上存在していた。このタンパク質  
10 をコードする塩基配列を配列番号19に示した。

本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分と言い、プレプロ部分とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分と言う。

15 配列番号2に示す成熟型hBSSP4(アミノ酸番号1～268)のアミノ酸配列はアミノ酸268個から成るhBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数804個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。  
20

25 配列番号4に示す成熟型hBSSP4(アミノ酸番号1～270)のアミノ酸配列はアミノ酸270個から成るhBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数810個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。



配列番号6に示す成熟型hBSSP4（アミノ酸番号1～257）のアミノ酸配列はアミノ酸257個から成るhBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数771個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

10 配列番号8に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～97）のアミノ酸配列はアミノ酸97個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数291個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

15 配列番号10に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～158）のアミノ酸配列はアミノ酸158個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数474個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

20 配列番号12に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～82）のアミノ酸配列はアミノ酸82個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数246個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

25 配列番号14に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～185）のアミノ酸配列はアミノ酸185個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数555個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

配列番号16に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～80）のアミノ酸配列は

アミノ酸 80 個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数 240 個から成る。アミノ酸番号-49~-1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15~-1 はプロ部分であり、hBSSP4 の前駆体と考えられる。

5        配列番号 18 に示す hBSSP4 (アミノ酸番号 1~253) のアミノ酸配列はアミノ酸 253 個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数 759 個から成る。アミノ酸番号-49~-1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15~-1 はプロ部分であり、hBSSP4 の前駆体と考えられる。

10       配列番号 20 に示す成熟型 mBSSP4 (アミノ酸番号 1~259) のアミノ酸配列はアミノ酸 259 個から成る mBSS4 成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数 777 個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中の N 末端のアミノ酸 1~数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49~-1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15~-1 はプロ部分であり、mBSSP4 の前駆体と考えられる。

15

なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって 1 個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であつてもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 または 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 または 20 のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および/または挿入を含むと解する。特に、配列番号 2、4、6 または 20 に示す hBSSP4 もしくは mBSSP4 成熟型タンパク質の N 末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせ

20

25

ても、活性が保持されることを本発明者らは証明している。

すなわち、本発明のタンパク質には配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 または 20 のいずれかに記載のアミノ酸配列、さらに、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17 または 19 に示した塩基配列によ  
5 ってコードされるアミノ酸配列またはこれらのアミノ酸配列において 1 もしくは  
数個のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入されたアミノ酸配列を含  
み、セリンプロテアーゼファミリーに属するタンパク質が含まれる。

所望のアミノ酸に対するコドンはその自体公知であり、その選択も任意でよく、  
例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる  
10 (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Res., 9, r43, 1981)。従って、コド  
ンの縮重を考慮して塩基配列を適宜改変したものもまた本発明の塩基配列に含ま  
れる。さらに、これら塩基配列のコドンの一部改変は、常法に従い、所望の改変  
をコードする合成オリゴヌクレオチドから成るプライマーを利用した部位特異的  
変異導入法 (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81, 5662,  
15 1984) 等に従って行うことができる。

さらに、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17 または 19 の  
いずれかに記載の塩基配列を含む塩基配列またはこれらに相補的な塩基配列とハ  
イブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク  
質が本発明による hBSSP4 もしくは mBSSP4 と同等の性質を有する限り  
20 その DNA は本発明による DNA に含有される。ストリンジェントな条件下で特  
定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパ  
ク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。本発明におけるストリンジ  
ェントな条件とは、例えば、5×SSC、5%デンハート溶液 (0.1% BSA、0.1% Ficoll 400、0.1% PVP)、0.5% SDS およ  
び 20 μg/ml 変性サケ精子 DNA を含有する溶液中で、37℃にて一夜イン  
25 キュベートし、ついで室温にて 0.1% SDS 含有 2×SSC で洗浄する条件  
である。SSC の代わりに適宜 SSPE を使用してもよい。

配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17 または 19 のいずれか  
に記載の塩基配列に基づいて、hBSSP4 もしくは mBSSP4 遺伝子を検出

するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得  
5 ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいはPCRの様な核酸の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。  
10

さらに、本発明が提供するhBSSP4もしくはmBSSP4のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するhBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl.  
15 Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5'非翻訳領域、または3'非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

20 本発明はまた、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19に示す塩基配列、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18または20に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列  
25 またはそれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac

4. 5、p cDNA3. 1、p S e c T a g 2、N o v a g e n社製のp E T、  
p B A C、P r o m e g a社製のp G E M、S t r a t a g e n e社製のp B l  
u e s c r i p t I IもしくはF a r m a c i a社製のp G E X、p U C 1 8/  
1 9、p F a s t B A C (G I B C O社製)等、本発明のタンパク質を発現し得  
5 るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載のp C R I I  
- T O P Oベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えばp S e  
c T a g 2 Aベクター、p S e c T a g 2 Bベクター (I n v i t r o g e n  
社)を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル  
核酸配列と、その3' 下流側に、T a g 核酸配列、切断可能核酸配列および本発  
10 明の成熟体または活性型タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができ  
るクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター  
(本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付け  
特許出願明細書)を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグ  
ナル、T a g 塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩  
15 基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列であ  
る、アミノ酸配列A s p - A s p - A s p - A s p - L y sをコードする塩基配  
列(当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、そのC末端部分に  
おいて、組換え融合タンパク質が切断される。)を用いることが好ましい。

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩  
20 基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転  
換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、  
本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞  
外に分泌することが可能な全ての細胞(微生物を含む)が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細  
25 胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、C H O細胞、C O S  
細胞、B H K細胞、V e r o細胞、ミエローマ細胞、H E K 2 9 3細胞、H e L  
a細胞、J u r k a t細胞、マウスL細胞、マウスC 1 2 7細胞、マウスF M 3  
A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S 2、S f 9、S f 2 1、H  
i g h F i v e <sup>TM</sup> (登録商標)細胞等がある。本明細書における微生物とは、

大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

5 本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または／  
およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を本発明の発現ベクターに組込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的に本発明のタンパク質と同義語である。

10 上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リポポリアミン法、DEAEーデキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

15 本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生されたhBSSP4もしくはmBSSP4を採取する、hBSSP4もしくはmBSSP4の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

20 本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。

25 本発明は、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子とは、hBSSP4もしくはmBSSP4をコードするcDNA、ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、hBSSP4もしくはmBSSP4の機能あるいは発現調節の研究、hBSSP4もしくはmBSSP4が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、hBSSP4もしくはmBSSP4の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）の

F L P リコンビナーゼ系等による *in vivo* における部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

5        マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

      まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェ  
10        ニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6 週齢）、交  
15        配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

      効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にイン  
      ジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植  
20        する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化  
      するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくは  
25        RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質またはその断片に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

      本発明のノックアウトマウスは、m B S S P 4 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意



の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

10 相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

20 本発明はまた、hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2、4、6、18または20のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

25 本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回

5 づつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistar  
rおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6  
およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、  
例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾  
臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合  
させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することがで  
10 きる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化hBSSP4またはmB  
SSP4と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定するこ  
とによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方  
法 (Nature, 256, 495, 1975) やその変法 (J. Immunol. Method, 39, 285,  
1980, Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981, Nature, 285, 446, 1980) に従い実  
15 施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウ  
イルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高  
めるために、適宜レクチン、ポリーラージンもしくはDMSOを添加すること  
もできる。

骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、  
20 AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用いられる抗  
体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:  
1であり、PEG (好ましくはPEG1000～PEG6000) を10～8  
0%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分  
間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗hBSSP  
25 4もしくはmBSSP4抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方  
法が使用できるが、例えば、hBSSP4もしくはmBSSP4抗原を直接また  
は担体と共に吸着させた固相 (例えば、マイクロプレート) にハイブリドーマ培  
養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体  
(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用

いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗hBSSP4またはmBSSP4抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したhBSSP4またはmBSSP4を加え、固相に結合した抗BSSP4モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

抗hBSSP4もしくはmBSSP4モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン)を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。

ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗hBSSP4もしくはmBSSP4抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ(RIA)法、酵素免疫測定法(ELISA)法、FIA(蛍光イムノアッセイ)法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

#### 20 ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養

上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

- クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニピレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する (J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。
- 15 フラスコ内で培養を行う場合は、0～20%のFCSを含む細胞培養用培地 (IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等) を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。
- 20 1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

- 本発明によるモノクローナル抗体は、hBSSP4もしくはmBSSP4に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20
- 25 アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2および4のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモ

ノクローナル抗体は、本発明におけるhBSSP4もしくはmBSSP4特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2および4に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、BSSP4ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

抗hBSSP4またはmBSSP4モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 $\alpha$ -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。1gM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 $\beta$ -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハ

ブテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハブテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、hBSSP4もしくはmBSSP4を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片との免疫学的な結合に基づき、hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化hBSSP4もしくはmBSSP4と検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定する競合法を利用して検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定する方法が挙げられる。

サンドイッチ法によるhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とhBSSP4もしくはmBSSP4またはそ

の断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体および h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 またはその断片を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートおよびN-スクシニミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる 2 種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第 3 の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター 5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボ

- ヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルト
- 5 フタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等
- 10 が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。
- 15 標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として $\text{H}_2\text{O}_2$ を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラ
- 20 ラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することができ
- 25 ける。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したのものも含まれる。

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その



他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b') 2を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

10 測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、h B S S P 4もしくはm B S S P 4またはその断片を含む試料もしくはこれらの前駆体またはその断片を含む試料であれば限定されない。

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

15

## 実施例

### 実施例1 新規セリンプロテアーゼのクローニング

human brain cDNA library (Clontech社) を鋳型にして、プライマー配列1 ; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG (配列番号30), 2; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GA (配列番号31) に示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する塩基配列のプライマーを用いたPCR法でクローニングを行った。すなわち鋳型を5  $\mu$  l、10 $\times$ ExTaqバッファーを5  $\mu$  l、dNTPを5  $\mu$  l、上記プライマーを各10 pmol、ExTaq (TAKARA社製) を0.5  $\mu$  l加え滅菌水で全量を50  $\mu$  lとし、94 $^{\circ}$ C、0.5分、55 $^{\circ}$ C、0.5分、72 $^{\circ}$ C、1分のサイクルで35回PCRを行った。このPCR産物をTOPO TAクローニングキット (Invitrogen社) 添付のpCR II-TOPOベクターと混ぜ、室温で5分間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌Top 10に形質転換し、LB (Amp+) プレート (100  $\mu$  g/mlのアンピシリンを含有する) に播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シーケンサ

ー (ABI社) を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。得られた各クローンの配列を GenBank で相同性を調べ、未知であったクローン、BSSP4 遺伝子について 5' RACE、3' RACE 法により cDNA 全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。すなわち、BSSP4 クローン特異的プライマー、GSP1 プライマー (hBSSP4F1 (配列番号 32) または hBSSP4R1 (配列番号 36)、および GSP2 プライマー (hBSSP4F2 (配列番号 33) または hBSSP4R2 (配列番号 37)) を作製し、human brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を用いてこの試薬に付属する AP1 プライマーと上記 GSP1 プライマーのいずれかで 94℃、2 分を 1 サイクル、94℃、30 秒、60℃、30 秒、72℃、30 秒を 35 サイクルする PCR を行った。次に、この PCR 産物を 1/100 に希釈したものを 5 μl、10×バッファーを 5 μl、dNTP を 5 μl、10 μM の上記 GSP2 プライマーのいずれかを 10 pmol、試薬に付属する AP2 プライマーを 10 pmol、ExTaq を 0.5 ユニット、滅菌水で全量を 50 μl とし、先と同様に PCR を行った。この PCR 産物を上記 TOPO TA クローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを行い前記クローンの上流、下流領域を得た。この際、タンパク質の全長をカバーしていないと思われるクローンについては更に、新たに判明した塩基配列に基づいて下記に示す特異的プライマーを作製した。またこの配列を基にして ORF を増幅できるような下記に示すプライマー (hBSSP4F6 (配列番号 35) および hBSSP4R3/E (配列番号 38) または hBSSP4R4/E (配列番号 39)) を作製し、human brain Marathon-Ready cDNA を鋳型として PCR を行い同一クローンであることを確認し、これを TOPO TA クローニングキットに添付の pCRII-TOPO ベクターにクローニングし、全長の cDNA クローンが入ったプラスミド pCRII/hBSSP4 を得た。このプラスミド中に含まれる DNA の塩基配列を配列番号 1 に、この塩基配列から推定される hBSSP4 タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 2 に示す。配列番号 2 に示す hBSSP4 (アミノ酸番号 1~268) のアミノ酸配列はアミノ酸 268 個から成る hBSS4 成熟型あるいは活性型タンパク質である。配列番号 2 のアミノ酸配列において、アミノ酸番号 -49~-1 はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号 -1

5 5〜1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。セリンプロテ  
 アーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39〜42に示すAla-Ala-  
 His-Cysおよびアミノ酸番号192〜196に示すAsp-Ser-  
 Gly-Gly-Proを有し、かつ、それらのコンセンサス配列間にAspが  
 1カ所以上存在していた。

さらに、おそらくオルターナティブスプライシングに起因する異なる塩基配列  
 を有する8種のクローンも得られた。これらのDNAの塩基配列を配列番号3、  
 5、7、9、11、13、15および17に示す。さらに、これらの塩基配列から  
 10 推定されるアミノ酸配列を配列番号4、6、8、10、12、14、16およ  
 び18に示す。上記のように、これらの中には、セリンプロテアーゼのコンセン  
 サス配列を有するものおよび有しないものが含まれている。これらの遺伝子産物  
 (転写物または翻訳産物)はセリンプロテアーゼに対する調節因子などの機能を  
 有している可能性がある。

同様の手順により下記のプライマーを使用し、mouse brain Marathon-Ready  
 15 cDNA (Clontech社)を鋳型にして5' RACE、3' RACE法を行い、クロー  
 ニングしてマウスの相同性のある遺伝子pCRII/mBSSP4を得た。この  
 プラスミド中に含まれるDNAの塩基配列を配列番号19に、この塩基配列から  
 推定されるmBSSP4タンパク質のアミノ酸配列を配列番号20に示す。配列  
 番号20に示すmBSSP4 (アミノ酸番号1〜259)のアミノ酸配列はアミ  
 20 ノ酸259個から成るmBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質である。配列  
 番号20のアミノ酸配列において、アミノ酸番号-49〜-1はプレプロ部分あ  
 るいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15〜-1はプロ部分であり、m  
 BSSP4の前駆体と考えられる。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列とし  
 て、アミノ酸番号39〜42に示すAla-Ala-His-Cysおよびアミ  
 25 ノ酸番号192〜196に示すAsp-Ser-Gly-Gly-Proを有し、  
 かつ、それらのコンセンサス配列間にAspが1カ所以上存在していた。

human BSSP4    hBSSP4F1    Forward    AGGTCCTATCATCGACTCG    RACE

(配列番号32)

		hBSSP4F2	Forward	TGAGGACATGCTGTGTGCCGG	RACE
					(配列番号 3 3)
		hBSSP4F3	Forward	GTTGTGGGCGGCGAGGACAG	mature
					(配列番号 3 4)
5		hBSSP4F6	Forward	GCCATGGTGGTTTCTGGAGC	全長用
					(配列番号 3 5)
		hBSSP4R1	Reverse	TATGGTTTGTTCAGGTTGTCC	RACE
					(配列番号 3 6)
		hBSSP4R2	Reverse	AGGGCAATGTCTGCACAGGC	RACE
10					(配列番号 3 7)
		hBSSP4R3/E	Reverse	CTGAATTCCTAGGAGCGCGGCGGCC	全長用
					(配列番号 3 8)
		hBSSP4R4/E	Reverse	GAGAATTCGATATGTGGGCAGGGTTACA	全長用
					(配列番号 3 9)
15	mouse BSSP4	mBSSP4.1	Forward	ACAAACCATCTCTGTTCTCAG	RACE
					(配列番号 4 0)
		mBSSP4F2	Forward	GTCCCAGAAAGTAGGCATTG	RACE
					(配列番号 4 1)
		mBSSP4F3	Forward	CTCCACCCATACCAGCAATG	全長用
20					(配列番号 4 2)
		mBSSP4F4	Forward	ATTGTGGGAGGTGAGGACAG	mature
					(配列番号 4 3)
		mBSSP4.2	Reverse	TGCAGAGTTCGGAGTCGATG	RACE
					(配列番号 4 4)
25		mBSSP4R2	Reverse	ATCCAGCAGTCGGTCTTGGG	RACE
					(配列番号 4 5)
		mBSSP4R3/P	Reverse	ATTCTGCAGTTCCTTGTCTCTCGCTCAGG	全長用
					(配列番号 4 6)

実施例2 h B S S P 4もしくはm B S S P 4遺伝子のヒトおよびマウス臓器での発現

B a l b / c マウスあるいはその胎児の各種臓器から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit (Amersham-Pharmacia) のプロトコルに従い、mRNAを単離  
5 した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した。このフィルターを p C R I I / m B S S P 4 より m B S S P 4 の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T P で標識したプローブを  $5 \times$  S S C で希釈したものと、 $65^{\circ}\text{C}$  で一昼夜反応させた。同様に、human multiple tissue blot, human multiple tissue blot II および human brain multiple blot II  
10 (Clontech社製) 膜を p C R I I / h B S S P 4 の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T P で標識したプローブを  $5 \times$  S S C で希釈したものと、 $65^{\circ}\text{C}$  で一昼夜反応させた。その後、フィルターを  $2 \times$  S S C / 0.1% SDS で室温30分間、 $1 \times$  S S C / 0.1% SDS で室温30分間、 $0.1 \times$  S S C / 0.1% SDS で  $65^{\circ}\text{C}$  30分間で2回洗い、F L A 2000  
15 用イメージングプレート (富士フィルム社) に1日露光させ、解析した。human multiple tissue blot 膜 (図1)、human multiple tissue blot II 膜 (図2)、human brain multiple blot II 膜 (図3)、生後3ヶ月のマウスの各種臓器から調製した mRNA (図4)、生後1、3、12ヶ月のマウスの前立腺から調製した mRNA (図5) を用いた結果を示す。また、上記で作製した mRNA を  
20 Ready To Go RT-PCR Beads (Amersham-Pharmacia) を用いてキット添付のプロトコル通りに h B S S P 4 および m B S S P 4 について遺伝子特異的プライマー (ヒト: 配列番号33および38または39; マウス: 配列番号40および44) を用いて RT-PCR を行った。

ノザン・ブロット解析の場合、図1~3に示すように、h B S S P 4 は前立腺  
25 (図2、1.35~2.4 kb の間のバンド) および小脳 (図3、1.35~2.4 kb の間のバンド) で発現を示し、m B S S P 4 は前立腺および骨格筋で発現が認められた (図4)。また RT-PCR の結果、h B S S P 4 は胎児から成人の脳、胎盤、精巣および前立腺で発現が認められ、m B S S P 4 は新生児から成体マウスの前立腺で発現が認められた。ゆえに、脳、前立腺、胎盤、精巣および

骨格筋において、本新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。さらに、上記ノザン・プロット解析によって、配列番号7の塩基配列を有する転写物（約1.4～1.5 kb）の存在も確認された。

5 実施例3 hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼの発現

(1) 発現プラスミドの構築

プラスミドpCRII/hBSSP4またはpCRII/mBSSP4をテンプレートに、hBSSP4タンパク質またはmBSSP4タンパク質の成熟体タンパク質をコードするcDNA領域をPCR反応にて増幅した（使用したプライマーは、ヒトについては配列番号34および39の配列を有するプライマーであり、マウスについては配列番号43および46であったの配列を有するプライマーであった）。このPCR産物をそれぞれpTrc-HisB (Invitrogen) を BamHIで消化後、マングベーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法  
10  
15  
通りにライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミドpTrcHis/hBSSP4およびpTrcHis/mBSSP4を含む大腸菌を得た。

得られた大腸菌は、それぞれE. coli pTrcHis/hBSSP4およびE. coli pTrcHis/mBSSP4と命名し、1998年10月  
20  
29日より、受託番号FERM P-17037およびFERM P-17034の下、日本国茨城県つくば市東1丁目1-3通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に委託してある。

(2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを10mlのLB (Amp  
25  
+) 培地に接種し、一晚37℃で培養した。これを250mlのLB (Amp  
+) 培地に接種し、37℃で培養した。600nmの吸光度が0.5になった時、250μlの0.1M IPTG (イソプロピルーβ-D (-) チオガラクトピラノシド) を加え、更に5時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バッファー (10mMリン酸バッファー pH7.5、1mM EDTA) で懸濁

し、氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000rpm、4℃で20分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を0.5% Triton X-100を含む菌体破壊バッファーで2度洗浄し、Triton X-100を取り除くために水洗した後に8Mの尿素を含む変性バッファー(8M Urea、50 mM Tris pH8.5、20mM 2ME)で37℃で1時間浸透することで溶解した。この溶解液をTALON metal affinity resin (Clontech社製)に通し、10mMイミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100mMイミダゾール含有変性バッファーで溶出し、精製した。この精製物をPBSで一晩おきにバッファー交換しながら3日間透析し、タンパク質hBSSP4-HisおよびmBSSP4-Hisを得た。

実施例4 hBSSP4遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質のpFBTrypSigTag/hBSSP4を用いた発現

(1) pFBTrypSigTag/hBSSP4の作製

配列番号21および22の配列を有するオリゴヌクレオチドをアニールさせてNheIとBamHI消化したフラグメントをNheI-BamHI消化したpSecTag2A (Invitrogen社製)に挿入し、pSecTrypHisとした。5μgのpSecTrypHisベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のXhoIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase (宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

特開平9-149790またはBiochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997に記載されている方法に準じて、COLO201細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、プラスミドpSPORT/ニューロシンを得た。pSPORT/ニューロシンより、配列番号23および24の配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の3'側のXhoIサイトを10unitのXhoIで、37℃、3時間反応させることにより切断した。これと上記pSecTrypH

isをTAKARA ライゲーションキットを用いて挿入し、pSecTrypHis/ニューロシンを得た(図6)。

5 配列番号25および26の配列を有するプライマーを用いてpSecTrypHis/ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをpSecTag2AのNheIとHindIIIサイトに挿入しプラスミドpTrypSigを作製した。

10 プラスミドpSecTag2Aの1 $\mu$ g(0.1 $\mu$ l)を制限酵素NheIおよびBamHIで処理することにより、IgGkのリーダー配列をコードする領域を完全に除去した。この溶液に対して、配列番号47および48の配列を有するDNAをそれぞれ100pmoleづつ加え、70℃で10分間熱処理した後室温で30分間放置してアニーリングした。NheIとBamHIで処理したHis分泌シグナル配列とpSecTag2A 1 $\mu$ lづつにDNAライゲーションキットVer. 2(宝酒造株式会社)のI液を2.0 $\mu$ l加え、16℃で、30分間反応させた。

15 反応液に大腸菌コンピテントセルXL1-Blue(STRATAGENE社)0.1mlを加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、SOC培地(東洋紡績株式会社)を0.9ml加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000rpmで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、100 $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むアンピシリンLBプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち、His分泌シグナルのDNAが挿入されているものをPCRで選択し、それをpTrypHisとした。

25 pTrypHisのHis Tag領域を含むおよそ200bpを配列番号26および27の配列を有するプライマーを用いて増幅し、HindIIIとBamHIによる消化で生じたHis Tagとエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40bpの断片をpTrypSigに挿入してpTrypSigTagを作製した(図7A)。



pTrypSigTagのトリプシンシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号24と28の配列を有するプライマーを用いたPCRによって作製したcDNAをBglIIとBamHI消化によって切り出し、pFastBAC1 (GIBCO) のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号24と29の配列を有するプライマーを用いたPCRによって確認し、polyhedrinプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、pFBTrypSigTagとした。

5  $5\mu\text{g}$ のpFBTrypSigTagベクターに対して20単位のBamHIを加え、 $37^\circ\text{C}$ で4時間かけて切断した後、6単位のマングビーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温( $25^\circ\text{C}$ )で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のEcoRIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase (宝酒造)を加えて $65^\circ\text{C}$ で30分反応した。

10 E. coli pTrcHis/hBSSP4 (受託番号FERM P-17037) から得られるpTrcHis/hBSSP4またはpCRII/hBSSP4より定法に従いPCRを行い、hBSSP4の活性体領域のcDNAを得た。得られたcDNAをpFBTrypSigTagに挿入しpFBTrypSigTag/hBSSP4を得た(図7B)。この際、塩基配列を決定することにより、正しくhBSSP4が挿入されているかを確認した。

20 pFBTrypSigTag/hBSSP4をGibco BRL BAC-T0-BAC baculovirus expression systemのプロトコールに従ってバクミドDNA上にTrypsinogen signal peptide、His tagおよびエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラhBSSP4を持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-T0-BAC baculovirus expression systemのマニュアルに従いSf-9細胞で発現させたところ、ウィルス感染後2日目より培養上清中に分泌された。

25 E. coli pTrcHis/mBSSP4 (受託番号FERM P-17034) から得られるpTrcHis/mBSSP4または実施例1で得られたpCRII/mBSSP4を用いて、上記と同様にpFBTrypSigTag/mBSSP4を作製し、分泌させることができる。

## (2) 酵素活性の測定

この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質hBSSP4をキレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清をPBSバッファを用いてキレートカラム(Ni-NTA-Agarose, Qiagen社製)に供し、PBSにイミダゾール(和光純薬工業)を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られたイミダゾール溶出分画を、さらにPD-10カラム(Pharmacia社製)でPBSバッファに交換した。このサンプル50 $\mu$ Lにエントロキナーゼ(1U/1 $\mu$ L, Invitrogen社製)10 $\mu$ Lを混和し、室温で60分反応させた。次に各種合成基質(ペプチド研究所: Boc-Gln-Ala-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、Bz-Arg-MCA、Boc-Val-Leu-Lys-MCA、Pyr-Gly-Arg-MCA、Pro-Phe-Arg-MCA、Boc-Val-Pro-Arg-MCA、Z-Arg-Arg-MCA、Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCA)をDMSOに溶解し、1M Tris-HCl, (pH8.0)で希釈した0.2M基質溶液を50 $\mu$ L加え、さらに、37 $^{\circ}$ Cで反応した。1時間後に励起波長380nm、蛍光波長460nmにおける、酵素作用に生じるAMC(7-アミノ-4-メチルクマリル)の蛍光を測定することにより、活性を測定した。

その結果、組換え融合タンパク質hBSSP4は、セリンプロテアーゼ活性を示すことが示された。また、マウス由来のmBSSP4についても同様に活性を有することが示された。

#### 20 産業上の利用の可能性

本発明によって、単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ(hBSSP4およびmBSSP4)ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変種が提供される。さらに、本発明によって、hBSSP4およびmBSSP4タンパク質ならびにhBSSP4およびmBSSP4ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含有する組成物、それらの製造方法および使用が提供される。

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 21: Designed oligonucleotide to construct plasmid  
pSecTrypHis

5 SEQ ID NO: 22: Designed oligonucleotide to construct plasmid  
pSecTrypHis

SEQ ID NO: 23: Designed oligonucleotide primer to amplify  
neurosin-encoding sequence

SEQ ID NO: 24: Designed oligonucleotide primer to amplify  
neurosin-encoding sequence

10 SEQ ID NO: 25: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

SEQ ID NO: 26: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

15 SEQ ID NO: 27: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pTrypHis

SEQ ID NO: 28: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pTrypSigTag

SEQ ID NO: 29: Designed oligonucleotide primer to amplify a  
portion of plasmid pFBTrypSigTag

20 SEQ ID NO: 30: Designed oligonucleotide primer to amplify  
conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

SEQ ID NO: 31: Designed oligonucleotide primer to amplify  
conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

25 SEQ ID NO: 32: Designed oligonucleotide primer designated as  
hBSSP4F1 for RACE for human BSSP4 (forward)

SEQ ID NO: 33: Designed oligonucleotide primer designated as  
hBSSP4F2 for RACE for human BSSP4 (forward)

SEQ ID NO: 34: Designed oligonucleotide primer designated as  
hBSSP4F3 to amplify mature human BSSP4-encoding region (forward)

SEQ ID NO: 35: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F6 to amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (forward)

SEQ ID NO: 36: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R1 for RACE for human BSSP4 (reverse)

5 SEQ ID NO: 37: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R2 for RACE for human BSSP4 (reverse)

SEQ ID NO: 38: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R3/E to amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (reverse)

10 SEQ ID NO: 39: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R4/E to amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (reverse)

SEQ ID NO: 40: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4.1 for RACE for mouse BSSP4 (forward)

SEQ ID NO: 41: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F2 for RACE for mouse BSSP4 (forward)

15 SEQ ID NO: 42: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F3 to amplify full-length mouse BSSP4-encoding mRNA (forward)

SEQ ID NO: 43: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F4 to amplify mature mouse BSSP4-encoding region (forward)

20 SEQ ID NO: 44: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4.2 for RACE for mouse BSSP4 (reverse)

SEQ ID NO: 45: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4R2 for RACE for mouse BSSP4 (reverse)

SEQ ID NO: 46: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4R3/P to amplify full-length mouse BSSP4-encoding mRNA (reverse)

25 SEQ ID NO: 47: Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

SEQ ID NO: 48: Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号2のアミノ酸番号1～268に示すアミノ酸268個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2に示すアミノ酸配列において  
5 1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
2. 配列番号1の塩基番号151～954に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～268に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これ  
10 らに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
3. 配列番号4のアミノ酸番号1～270に示すアミノ酸270個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号1～270に  
15 示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
4. 配列番号3の塩基番号151～960に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号1～270に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、または、  
20 これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
5. 配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸257個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号1～257に  
25 示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

6. 配列番号5の塩基番号151～921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

7. 配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸97個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

8. 配列番号7の塩基番号151～441に示す塩基配列、配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

9. 配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸158個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

10. 配列番号9の塩基番号151～624に示す塩基配列、配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

11. 配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸82個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号12のアミノ酸番号1～82に

示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

5      12. 配列番号11の塩基番号151～396に示す塩基配列、配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10      13. 配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸185個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あ  
15      りはこれらの修飾体。

14. 配列番号13の塩基番号151～705に示す塩基配列、配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列を有するタンパク質  
20      と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

15. 配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸80個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号16のアミノ酸番号1～80に示す  
25      アミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

16. 配列番号15の塩基番号151～390に示す塩基配列、配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配

列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

17. 配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸253個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

18. 配列番号17の塩基番号151～909に示す塩基配列、配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号18のアミノ酸番号1～253に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

19. 配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸34個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

20. 配列番号1の塩基番号4～105に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

21. 配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示すアミノ酸15個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、ある



いはこれらの修飾体または断片。

22. 配列番号1の塩基番号106～150に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

23. 配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸259個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

24. 配列番号19の塩基番号227～1003に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

25. 配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸34個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

26. 配列番号19の塩基番号80～181に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

27. 配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸15個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

28. 配列番号19の塩基番号182～226に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

29. 配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸317個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

30. 配列番号1の塩基番号4～954に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

31. 配列番号2のアミノ酸番号15～268に示すアミノ酸283個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号15～268に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号15～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

32. 配列番号1の塩基番号106～954に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号15～268に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号15～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

33. 配列番号4のアミノ酸番号49～270に示すアミノ酸319個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号49～270に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号49～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

34. 配列番号3の塩基番号4～960に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号49～270に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号49～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

35. 配列番号4のアミノ酸番号15～270に示すアミノ酸285個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号15～270に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号15～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

36. 配列番号3の塩基番号106～960に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号15～270に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号15～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

37. 配列番号6のアミノ酸番号49～257に示すアミノ酸306個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号49

～257に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号49～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

5 38. 配列番号5の塩基番号4～921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号49～257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号49～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10 39. 配列番号6のアミノ酸番号15～257に示すアミノ酸272個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号15～257に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号15～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

15 40. 配列番号5の塩基番号106～921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号15～257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号15～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

20 41. 配列番号20のアミノ酸番号49～259に示すアミノ酸308個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号49～259に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号49～259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

25 42. 配列番号19の塩基番号80～1003に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号49～259に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、か

つ配列番号20のアミノ酸番号-49~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

43. 配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸274個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

44. 配列番号19の塩基番号182~1003に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

45. 配列番号1に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号1に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

46. 配列番号3に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号3に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

47. 配列番号5に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号5に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

48. 配列番号7に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号7に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

49. 配列番号9に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、配列番号9に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

50. 配列番号11に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリ

ンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 1 1 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

- 5 5 1. 配列番号 1 3 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 1 3 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

5 2. 配列番号 1 5 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 1 5 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

- 10 5 3. 配列番号 1 7 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 1 7 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

5 4. 配列番号 1 9 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 1 9 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

- 15 5 5. 請求項 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44～54 のいずれか 1 つに記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

- 20 5 6. 請求項 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44～54 のいずれか 1 つに記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

5 7. 請求項 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、30、32、34、36、38、40、45～53 のいずれか 1 つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生された h B S S P 4 を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

- 25 5 8. 請求項 24、26、28、42、44 または 54 記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生された m B S S P 4 を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

5 9. 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項 5 7 または 5 8 のいずれか 1 つに記載の製造法。

60. BSSP4遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。
61. BSSP4遺伝子がBSSP4をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項60記載のトランスジェニック非ヒト動物。
- 5 62. 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項60記載のトランスジェニック非ヒト動物。
63. mBSSP4遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。
64. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか
- 10 1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。
65. ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項64記載の抗体。
66. ヒト以外の温血動物に請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。
- 15 20 25 67. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体と、検体中の該タンパク質もしくはその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の該タンパク質またはその断片を測定する方法。
68. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、29、31、33、35、37または39のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とに

より、検体中のhBSSP4もしくはその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中のhBSSP4もしくはその断片を測定する方法。

69. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、29、31、33、35、37または39のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化hBSSP4と検体中のhBSSP4もしくはその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化hBSSP4の量から検体中のhBSSP4もしくはその断片の量を検出する、検体中のhBSSP4もしくはその断片を測定する方法。

70. 検体が体液である、請求項67～69のいずれか1つに記載の方法。

- 10 71. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質を含む、組織における、疾患の診断マーカー。

72. 脳における、アルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項71記載のマーカー。

- 15 73. 脳、前立腺、胎盤、精巣または骨格筋における、癌、炎症の診断に用いる請求項71記載のマーカー。

74. 精子および精巣における不妊症の診断に用いる請求項71記載のマーカー。

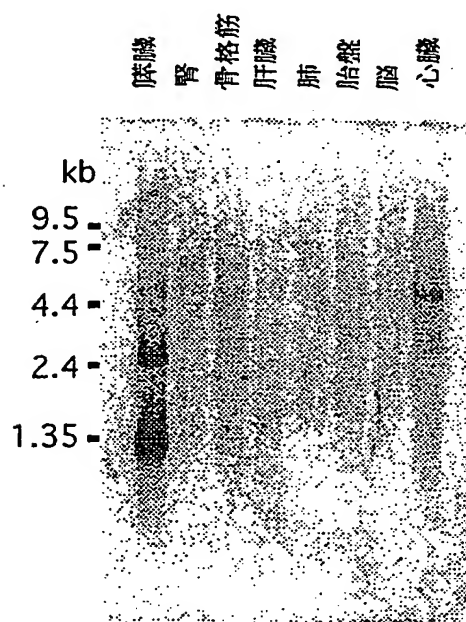
75. 前立腺における前立腺肥大症の診断に用いる請求項71記載のマーカー。



1/7

図 1

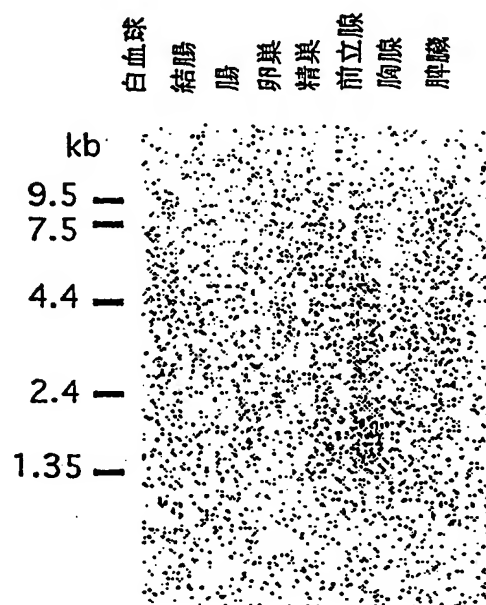
hBSSP-4



2/7

図 2

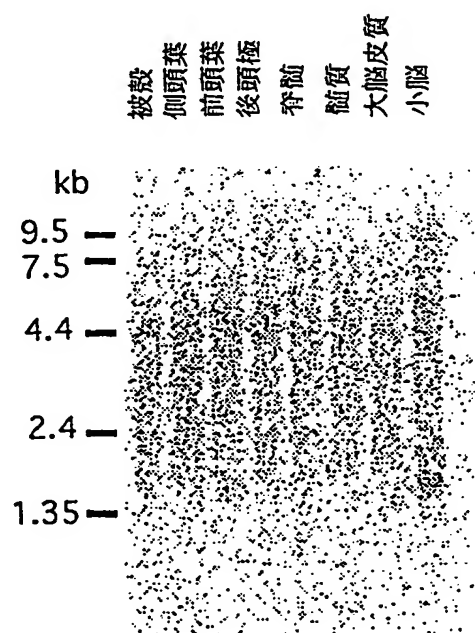
## hBSSP-4



3/7

図 3

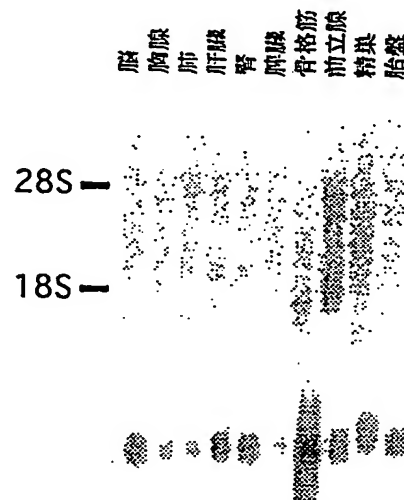
hBSSP-4



4/7

図 4

mBSSP-4



5/7

図 5

mBSSP-4

前立腺

1月3月12月

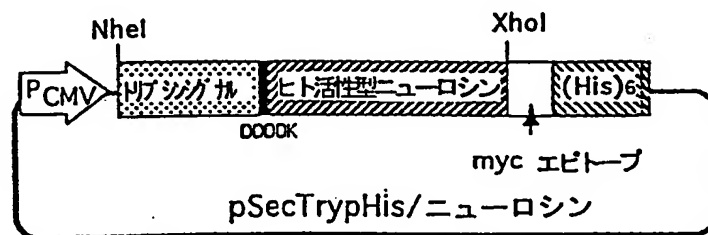
28S—

18S—



6 / 7

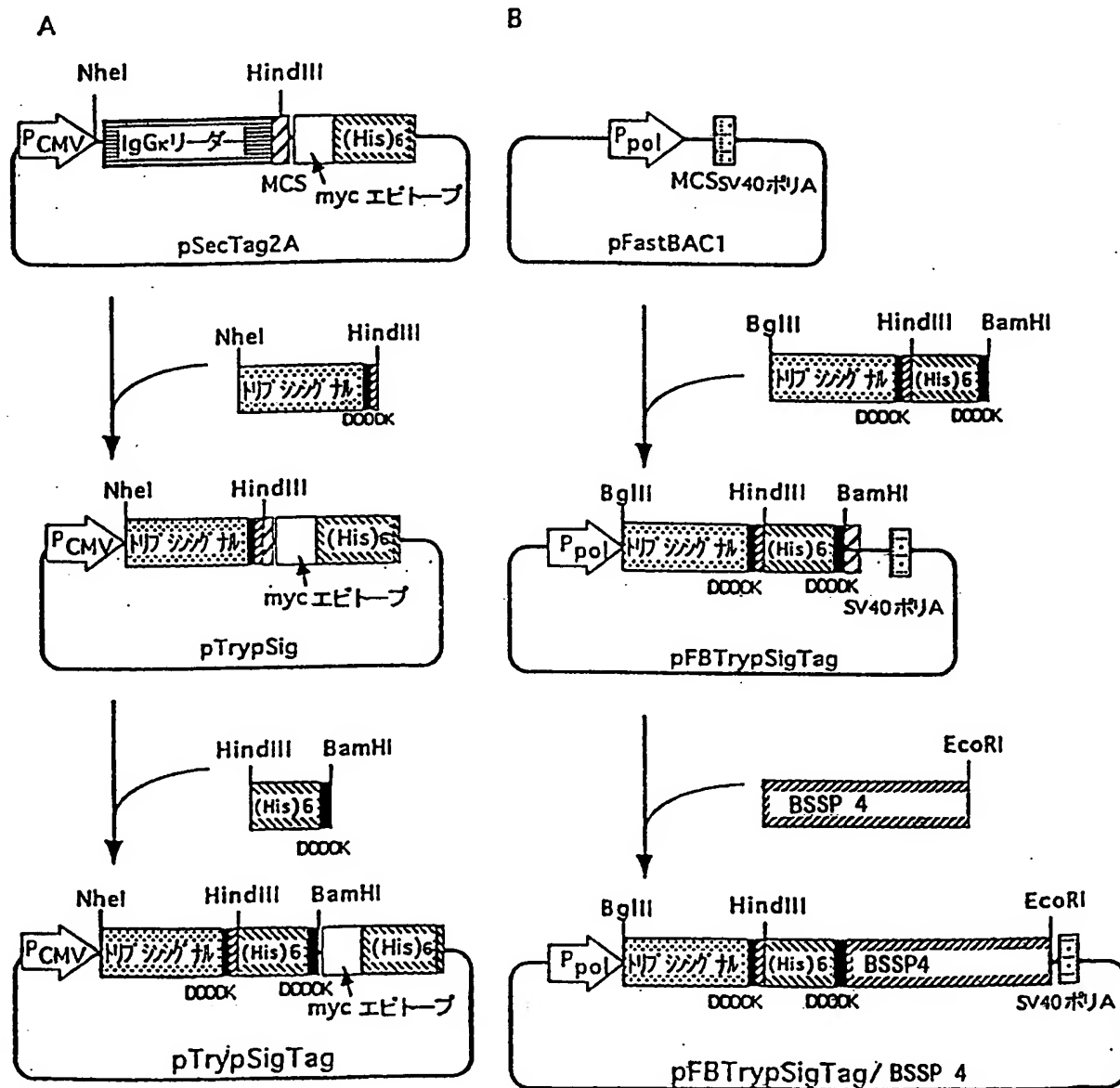
図 6



差替え用紙 (規則26)

7 / 7

図 7



差替え用紙 (規則26)

## SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.

<120> Novel serine protease BSSP4

<130> 661639

<150> JP 10-347813

<151> 1998-11-20

<160> 48

<210> 1

<211> 1282

<212> DNA

<213> human

<400> 1

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc   51
    Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
                -45                -40                -35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc  102
    Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
                -30                -25                -20

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt  153
    Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
                -15                -10                -5                -1    1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc  204
    Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

```



Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala  
 175 180 185  
 tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg 765  
 Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp  
 190 195 200 205  
 ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg 816  
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg  
 210 215 220  
 ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc 867  
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile  
 225 230 235  
 gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg 918  
 Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg  
 240 245 250 255  
 gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc gcc gcg cgc tcc tagggcgag cgggacgcgg974  
 Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Ala Ala Arg Ser  
 260 265  
 ggctcggatc tgaaaggcgg ccagatccac atctggatct ggatctgcgg cggcctcggg 1034  
 cggtttcccc cggcgtaaata aggtcatct acctctacct ctggggggccc ggacggctgc 1094  
 tgcggaaagg aaacccctc cccgaccgc ccgacggcct caggccccgc cctccaaggc 1154  
 atcaggcccc gcccaacggc ctcatgtccc cggccccacg acttccggcc ccgccccggg 1214  
 gccccagcgc ttttgtgtat ataaatgtta atgattttta taggtatttg taaccctgcc 1274  
 cacatatac 1282

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 317

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

BNSDOCID: <WO 0031277A1 | >

5/44

175	180	185	
Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp			
190	195	200	205
Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg			
210	215	220	
Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile			
225	230	235	
Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg			
240	245	250	255
Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Ala Ala Arg Ser			
260	265		

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1007

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 3

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc	51
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly	
-45 -40 -35	
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc	102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala	
-30 -25 -20	
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt	153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val	
-15 -10 -5 -1 1	
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc	204
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile	

6/44

5	10	15	
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg	255		
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp			
20	25	30	35
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg	306		
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu			
40	45	50	
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc	357		
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser			
55	60	65	
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag	408		
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys			
70	75	80	85
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag	459		
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln			
90	95	100	
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc	510		
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu			
105	110	115	120
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561		
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly			
125	130	135	
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc	612		
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile			
140	145	150	
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc	663		
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro			
155	160	165	170
atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct	714		

7/44

Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala  
 175 180 185  
 tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg 765  
 Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp  
 190 195 200 205  
 ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg 816  
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg  
 210 215 220  
 ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc 867  
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile  
 225 230 235  
 gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg 918  
 Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg  
 240 245 250 255  
 gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc cca gcg ctt ttg tgt ata taaatgttaa 970  
 Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ile  
 260 265 270  
 tgatttttat aggtatttgt aaccctgccc acatata 1007

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 319

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 4

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

8/44

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
 40 45 50  
 Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
 55 60 65  
 Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys  
 70 75 80 85  
 Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln  
 90 95 100  
 Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu  
 105 110 115 120  
 Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly  
 125 130 135  
 Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile  
 140 145 150  
 Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro  
 155 160 165 170  
 Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala  
 175 180 - 185  
 Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp  
 190 195 200 205  
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg  
 210 215 220  
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile

9/44

225	230	235	
Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg			
240	245	250	255
Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ile			
260	265	270	

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1036

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 5

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15

-10

-5

-1 1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

5

10

- 15

cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255

Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

20

25

30

35

gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306

Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu

10/44

40	45	50	
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc			357
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser			
55	60	65	
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag			408
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys			
70	75	80	85
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag			459
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln			
90	95	100	
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc			510
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu			
105	110	115	120
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga			561
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly			
125	130	135	
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc			612
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile			
140	145	150	
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc			663
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro			
155	160	165	170
atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct			714
Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly-Glu Arg Asp Ala			
175	180	185	
tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg			765
Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp			
190	195	200	205
ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg			816



11/44

Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg

210

215

220

ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc 867

Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile

225

230

235

gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc ccc cgg gcc cca gcg ctt ttg tgt 918

Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Pro Arg Ala Pro Ala Leu Leu Cys

240

245

250

255

ata taaatgttaa tgatttttat aggtatttgt aaccctgccc acatatctta 971

Ile

tttattcctc caatttcaat aaattattta ttctccagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1031

aaaaa

1036

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 6

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15

-10

-5

-1 1

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

5

10

15

Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

12/44

20	25	30	35													
Val	Ile	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Lys	Asp	Asn	Leu	Asn	Lys	Pro	Tyr	Leu
	40							45							50	
Phe	Ser	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Trp	Gln	Leu	Gly	Asn	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser
	55							60							65	
Gln	Lys	Val	Gly	Val	Ala	Trp	Val	Glu	Pro	His	Pro	Val	Tyr	Ser	Trp	Lys
70					75					80					85	
Glu	Gly	Ala	Cys	Ala	Asp	Ile	Ala	Leu	Val	Arg	Leu	Glu	Arg	Ser	Ile	Gln
		90						95							100	
Phe	Ser	Glu	Arg	Val	Leu	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Asp	Ala	Ser	Ile	His	Leu
	105						110					115			120	
Pro	Pro	Asn	Thr	His	Cys	Trp	Ile	Ser	Gly	Trp	Gly	Ser	Ile	Gln	Asp	Gly
			125						130					135		
Val	Pro	Leu	Pro	His	Pro	Gln	Thr	Leu	Gln	Lys	Leu	Lys	Val	Pro	Ile	Ile
		140						145						150		
Asp	Ser	Glu	Val	Cys	Ser	His	Leu	Tyr	Trp	Arg	Gly	Ala	Gly	Gln	Gly	Pro
155				160						165					170	
Ile	Thr	Glu	Asp	Met	Leu	Cys	Ala	Gly	Tyr	Leu	Glu	Gly	Glu	Arg	Asp	Ala
			175						180					185		
Cys	Leu	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Met	Cys	Gln	Val	Asp	Gly	Ala	Trp
	190						195					200			205	
Leu	Leu	Ala	Gly	Ile	Ile	Ser	Trp	Gly	Glu	Gly	Cys	Ala	Glu	Arg	Asn	Arg
			210						215					220		
Pro	Gly	Val	Tyr	Ile	Ser	Leu	Ser	Ala	His	Arg	Ser	Trp	Val	Glu	Lys	Ile
		225						230						235		
Val	Gln	Gly	Val	Gln	Leu	Arg	Gly	Arg	Pro	Arg	Ala	Pro	Ile	Leu	Leu	Cys
240					245					250					255	
Ile																

13/44

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1232

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 7

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
      -45          -40          -35
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
      -30          -25          -20
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
      -15          -10          -5          -1    1
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
      5          10          15
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca gga caa cct gaa caa acc ata cct 255
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Gln Pro Glu Gln Thr Ile Pro
      20          25          30          35
gtt ctc tgt gct gct ggg ggc ctg gca gct ggg gaa ccc tgg ctc tcg gtc 306
Val Leu Cys Ala Ala Gly Gly Leu Ala Ala Gly Glu Pro Trp Leu Ser Val
      40          45          -    50
cca gaa ggt ggg tgt tgc ctg ggt gga gcc cca ccc tgt gta ttc ctg gaa 357
Pro Glu Gly Gly Cys Cys Leu Gly Gly Ala Pro Pro Cys Val Phe Leu Glu
      55          60          65
gga agg tgc ctg tgc aga cat tgc cct ggt gcg tct cga gcg ctc cat aca 408
Gly Arg Cys Leu Cys Arg His Cys Pro Gly Ala Ser Arg Ala Leu His Thr

```

70	75	80	85	
gtt ctc aga gcg ggt cct gcc cat ctg cct acc tgatgcctct	atccacctcc	461		
Val Leu Arg Ala Gly Pro Ala His Leu Pro Thr				
90	95			
ctccaaacac ccactgctgg atctcaggct gggggagcat ccaagatgga	gttcccttgc	521		
cccaccctca gaccctgcag aagctgaagg ttcctatcat cgactcggaa	gtctgcagcc	581		
atctgtactg gcggggagca ggacagggaac ccactactga ggacatgctg	tgtgccggct	641		
acttggaggg ggagcgggat gcttgtctgg gcgactccgg gggccccctc	atgtgccagg	701		
tggacggcgc ctggctgctg gccggcatca tcagctgggg cgagggtgt	gccgagcgca	761		
acaggccccg ggtctacatc agcctctctg cgcaccgctc ctgggtggag	aagatcgtgc	821		
aaggggtgca gctccgcggg cgcgctcagg ggggtggggc cctcaggga	ccgagccagg	881		
gctctggggc cgccgcgcgc tccctagggcg cagcgggacg cggggctcgg	atctgaaagg	941		
cggccagatc cacatctgga tctggatctg cggcggcctc gggcggtttc	ccccgccgta	1001		
aataggctca tctacctcta cctctggggg cccggacggc tgctgcggaa	aggaaacccc	1061		
ctccccgacc cgcccagcgg cctcaggccc cgccctccaa ggcatcaggc	cccgcccaac	1121		
ggcctcatgt ccccgcccc acgacttccg gcccccccc cgggccccag	cgcttttgtg	1181		
tatataaatg ttaatgattt ttataggtat ttgtaaccct gcccacatat	c	1232		

<213> human

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

15/44

-15                      -10                      -5                      -1    1  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
                          5                                      10                                      15  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Gln Pro Glu Gln Thr Ile Pro  
                          20                                      25                                      30                                      35  
 Val Leu Cys Ala Ala Gly Gly Leu Ala Ala Gly Glu Pro Trp Leu Ser Val  
                          40                                      45                                      50  
 Pro Glu Gly Gly Cys Cys Leu Gly Gly Ala Pro Pro Cys Val Phe Leu Glu  
                          55                                      60                                      65  
 Gly Arg Cys Leu Cys Arg His Cys Pro Gly Ala Ser Arg Ala Leu His Thr  
                          70                                      75                                      80                                      85  
 Val Leu Arg Ala Gly Pro Ala His Leu Pro Thr  
                          90                                      95

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 952

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 9

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc    51  
     Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
                          -45                                      -40                                      -35  
 acc ttc acc tcc ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc    102  
 Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
                          -30                                      -25                                      -20  
 agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt    153  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
                          -15                                      -10                                      -5                                      -1    1

16/44

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
                     5                    10                    15  
 cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr  
                     20                    25                    30                    35  
 ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg 306  
 Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu  
                     40                    45                    50  
 tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc atc act gag gac atg ctg tgt gcc 357  
 Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala  
                     55                    60                    65  
 ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc 408  
 Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
                     70                    75                    80                    85  
 ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg 459  
 Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp  
                     90                    95                    100  
 ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct 510  
 Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser  
                     105                    110                    115                    120  
 gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg 561  
 Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly  
                     125                    130                    135  
 cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc 612  
 Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala  
                     140                    145                    150  
 gcc gcg cgc tcc tagggcgag cgggacgcgg ggctcggatc tgaaaggcgg 664  
 Ala Ala Arg Ser

17/44

155

ccagatccac atctggatct ggatctgcgg cggcctcggg cggtttcccc cgccgtaaata 724  
 aggctcatct acctctacct ctggggggccc ggacggctgc tgcggaaagg aaacccccctc 784  
 cccgacccgc ccgacggcct caggccccgc cctccaaggc atcaggcccc gcccaacggc 844  
 ctcatgtccc cgccccacg acttccggcc ccgccccgg gccccagcgc ttttgttat 904  
 ataaatgtta atgattttta taggtatttg taaccctgcc cacatatc 952

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 207

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 10

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
 -45 -40 -35  
 Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
 -30 -25 -20  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr  
 20 25 30 35  
 Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Val-Cys Ser His Leu  
 40 45 50  
 Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala  
 55 60 65  
 Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 70 75 80 85

18/44

Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp  
                     90                    95                    100  
 Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser  
           105                    110                    115                    120  
 Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly  
                     125                    130                    135  
 Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala  
           140                    145                    150  
 Ala Ala Arg Ser  
 155

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1083

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 11

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51  
       Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
                     -45                    -40                    -35  
 acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102  
       Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
                     -30                    -25                    -20  
 agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag-ctg aac cgg gtt 153  
       Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
           -15                    -10                    -5                    -1    1  
 gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
       Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
                     5                    10                    15



19/44

cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
 40 45 50  
 ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc 357  
 Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
 55 60 65  
 cag aag ttc cct tgc ccc acc ctc aga ccc tgc aga agc tgaaggttcc 406  
 Gln Lys Phe Pro Cys Pro Thr Leu Arg Pro Cys Arg Ser  
 70 75 80  
 tatcatcgac tcggaagtct gcagccatct gtactggcgg ggagcaggac agggacccat 466  
 cactgaggac atgctgtgtg ccggctactt ggagggggag cgggatgctt gtctgggcga 526  
 ctccgggggc cccctcatgt gccaggtgga cggcgcttgg ctgctggccg gcatcatcag 586  
 ctggggcgag ggctgtgccg agcgcaacag gcccggggtc tacatcagcc tctctgcgca 646  
 ccgctccttg gtggagaaga tcgtgcaagg ggtgcagctc cgcgggcgcg ctcagggggg 706  
 tggggccctc agggcaccga gccagggctc tggggccgcc gcgcgctcct agggcgcagc 766  
 gggacgcggg gctcggatct gaaaggcggc cagatccaca tctggatctg gatctgcggc 826  
 ggcctcgggc ggtttccccc gccgtaaata ggctcatcta cctctacctc tgggggcccg 886  
 gacggctgct gcggaaagga aacccctcc ccgaccgcc cgacggcctc agggcccgcc 946  
 ctccaaggca tcaggccccg cccaacggcc tcatgtcccc gccccacga cttccggccc 1006  
 cgccccggg cccagcgt tttgtgtata taaatgttaa tgatttttat aggtatttgt 1066  
 aacctgccc acatata - 1083

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tgc aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102

21/44

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
 -30 -25 -20  
 agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
 40 45 50  
 ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc 357  
 Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
 55 60 65  
 cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag 408  
 Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys  
 70 75 80 85  
 gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag 459  
 Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln  
 90 95 100  
 ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc 510  
 Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu  
 105 110 115 120  
 cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga 561  
 Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly  
 125 130 135

22/44

gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctc tcc aag gca tca ggc ccc gcc caa 612  
 Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Ser Lys Ala Ser Gly Pro Ala Gln  
 140 145 150  
 cgg cct cat gtc ccc gcc ccc acg act tcc ggc ccc gcc ccg ggc ccc agc 663  
 Arg Pro His Val Pro Ala Pro Thr Thr Ser Gly Pro Ala Pro Gly Pro Ser  
 155 160 165 170  
 gct ttt gtg tat ata aat gtt aat gat ttt tat agg tat ttg taaccctgcc 715  
 Ala Phe Val Tyr Ile Asn Val Asn Asp Phe Tyr Arg Tyr Leu  
 175 180 185  
 cacatatac 723

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 234

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 14

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
 -45 -40 -35  
 Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
 -30 -25 -20  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
 40 45 50

23/44

Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
           55                          60                          65  
 Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys  
           70                          75                          80                          85  
 Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln  
                           90                          95                          100  
 Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu  
           105                          110                          115                          120  
 Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly  
                           125                          130                          135  
 Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Ser Lys Ala Ser Gly Pro Ala Gln  
           140                          145                          150  
 Arg Pro His Val Pro Ala Pro Thr Thr Ser Gly Pro Ala Pro Gly Pro Ser  
           155                          160                          165                          170  
 Ala Phe Val Tyr Ile Asn Val Asn Asp Phe Tyr Arg Tyr Leu  
                           175                          180                          185

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1004

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 15

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg-ggc tgt ctc ggc 51  
           Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
                           -45                          -40                          -35  
 acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102  
           Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
                           -30                          -25                          -20

24/44

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15

cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35

gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gat tcc ctt gcc cca ccc tca gac 306  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Ser Leu Ala Pro Pro Ser Asp  
 40 45 50

cct gca gaa gct gaa ggt tcc tat cat cga ctc gga agt ctg cag cca tct 357  
 Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Tyr His Arg Leu Gly Ser Leu Gln Pro Ser  
 55 60 65

gta ctg gcg ggg agc agg aca ggg acc cat cac tgaggacatg ctgtgtgccg 410  
 Val Leu Ala Gly Ser Arg Thr Gly Thr His His  
 70 75 80

gctacttggg gggggagcgg gatgcttgct tgggcgactc cgggggcccc ctcattgtgcc 470  
 aggtggacgg cgcttgctg ctggccggca tcatcagctg gggcgagggc tgtgccgagc 530  
 gcaacaggcc cggggtctac atcagcctct ctgcgcaccg ctcttggtg gagaagatcg 590  
 tgcaagggtg gcagctccgc gggcgcgctc aggggggtgg ggccctcagg gcaccgagcc 650  
 agggctcttg ggccgcccgc cgctcctagg gcgcagcggg acgcggggct cggatctgaa 710  
 aggcggccag atccacatct ggatctggat ctgcggcggc ctcgggcggg ttccccgcc 770  
 gtaaataggc tcatctacct ctacctctgg gggcccggac ggctgctgcg gaaaggaaac 830  
 cccctccccg accgcccga cggcctcagg ccccgccctc caaggcatca ggccccgcc 890  
 aacggcctca tgtccccgc cccacgactt ccggccccgc ccccgggccc cagcgctttt 950  
 gtgtatataa atgttaatga tttttatagg tatttgtaac cctgccaca tate 1004

25/44

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 16

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
-45 -40 -35  
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
-30 -25 -20  
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
-15 -10 -5 -1 1  
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
5 10 15  
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
20 25 30 35  
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Ser Leu Ala Pro Pro Ser Asp  
40 45 50  
Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Tyr His Arg Leu Gly Ser Leu Gln Pro Ser  
55 60 65  
Val Leu Ala Gly Ser Arg Thr Gly Thr His His  
70 75 80

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 948

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 17

26/44

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
-45 -40 -35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
-30 -25 -20

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
-15 -10 -5 -1 1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
5 10 15

cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp
20 25 30 35

gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu
40 45 50

ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc 357
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser
55 60 65

cag aaa gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag 408
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys
70 75 80 85

gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag 459
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln
90 95 100

ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc 510
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu

```



27/44

105	110	115	120	
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561			
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly				
125	130	135		
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc	612			
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile				
140	145	150		
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc	663			
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro				
155	160	165	170	
atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct	714			
Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala				
175	180	185		
tgt ctg gtg agc tcc ctc gag ccc ccc acc cct ggc cag gag ggc ctc ggg	765			
Cys Leu Val Ser Ser Leu Glu Pro Pro Thr Pro Gly Gln Glu Gly Leu Gly				
190	195	200	205	
aag gag cca gcg tca gtc ctg tcc cca ctg agc ccc aca acc tct ccc tgg	816			
Lys Glu Pro Ala Ser Val Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Thr Ser Pro Trp				
210	215	220		
cct cct ccc cag aac tgg ctg tgc ctg aca gtc ccg ggt ccc cat aga acc	867			
Pro Pro Pro Gln Asn Trp Leu Cys Leu Thr Val Pro Gly Pro His Arg Thr				
225	230	235		
agc ctc agc ctg gct cag cca ctc act tat ttg ttc aga cat taaactgggc	919			
Ser Leu Ser Leu Ala Gln Pro Leu Thr Tyr Leu Phe Arg His				
240	245	250		
atcccagctg caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa				948

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 302

<213> human

&lt;400&gt; 18

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
-45 -40 -35  
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
-30 -25 -20  
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
-15 -10 -5 -1 1  
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
5 10 15  
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
20 25 30 35  
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
40 45 50  
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
55 60 65  
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys  
70 75 80 85  
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln  
90 95 100  
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu  
105 110 115 - 120  
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly  
125 130 135  
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile  
140 145 150  
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro

5/44

175	180	185	
Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp			
190	195	200	205
Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg			
210	215	220	
Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile			
225	230	235	
Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg			
240	245	250	255
Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Ala Ala Arg Ser			
260	265		

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1007

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 3

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc	51
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly	
-45	-40
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc	102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala	
-30	-25
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt	153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val	
-15	-10
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc	204
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile	

BNSDOCID: <WO\_0031277A1\_IA>

3/44

Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala  
 175 180 185  
 tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg 765  
 Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp  
 190 195 200 205  
 ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg 816  
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg  
 210 215 220  
 ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc 867  
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile  
 225 230 235  
 gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg 918  
 Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg  
 240 245 250 255  
 gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc gcc gcg cgc tcc tagggcgag cgggacgcgg974  
 Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Ala Ala Arg Ser  
 260 265  
 ggctcggatc tgaaaggcgg ccagatccac atctggatct ggatctgcgg cggcctcggg 1034  
 cggtttcccc cgccgtaaat aggtctatct acctctacct ctggggggccc ggacggctgc 1094  
 tgcggaagg aaacccctc cccgaccgc ccgacggcct caggccccgc cctccaaggc 1154  
 atcaggcccc gcccaacggc ctcatgtccc cgccccacg acttccggcc ccgccccgg 1214  
 gccccagcgc ttttgttat ataaatgta atgattttta taggtatttg taaccctgcc 1274  
 cacatata 1282

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 317

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

2/44

5	10	15	
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg	255		
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp			
20	25	30	35
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg	306		
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu			
40	45	50	
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc	357		
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser			
55	60	65	
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag	408		
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys			
70	75	80	85
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag	459		
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln			
90	95	100	
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc	510		
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu			
105	110	115	120
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561		
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly			
125	130	135	
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc	612		
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile			
140	145	150	
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc	663		
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro			
155	160	165	170
atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct	714		

## SEQUENCE LISTING

<110> Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.

<120> Novel serine protease BSSP4

<130> 661639

<150> JP 10-347813

<151> 1998-11-20

<160> 48

<210> 1

<211> 1282

<212> DNA

<213> human

<400> 1

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15

-10

-5

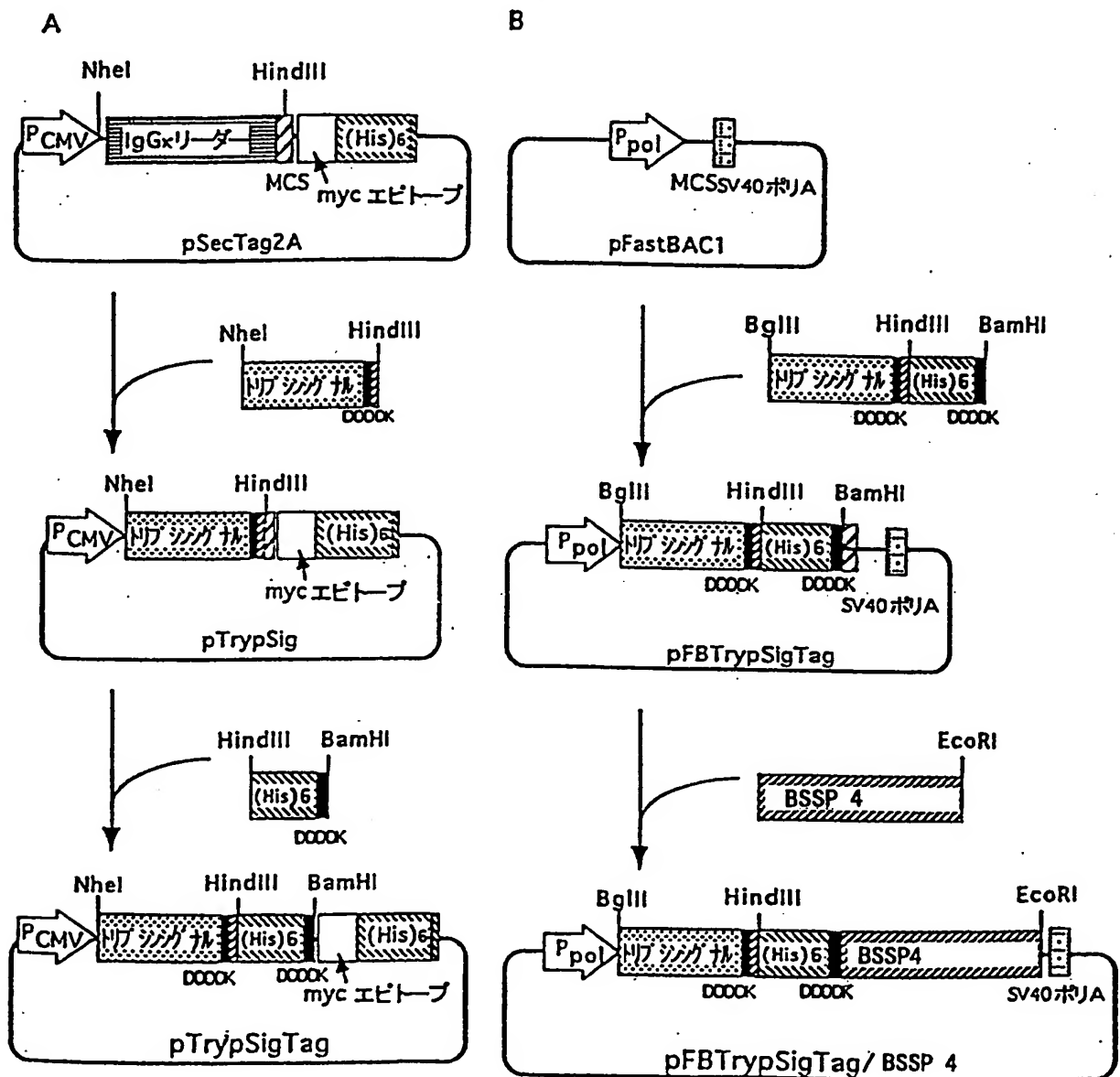
-1 1

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

7 / 7

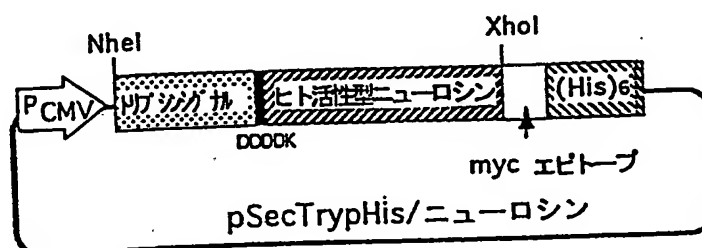
図 7





6 / 7

図 6



5/7

図 5

mBSSP-4

前立腺

1月3月12月

28S—

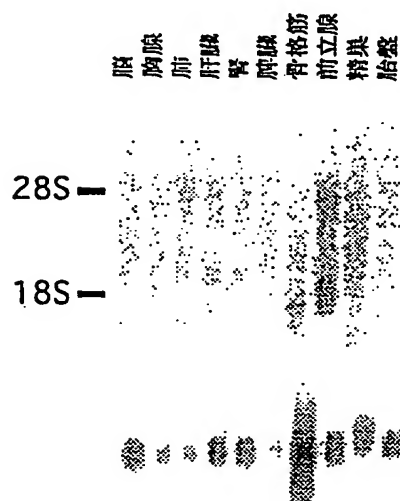
18S—



4/7

図 4

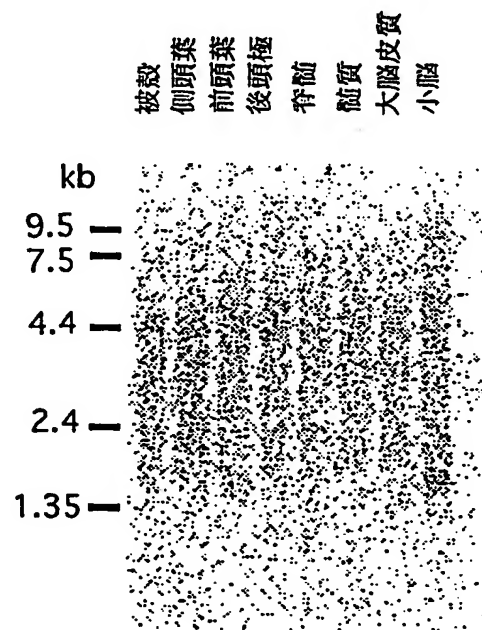
mBSSP-4



3/7

図 3

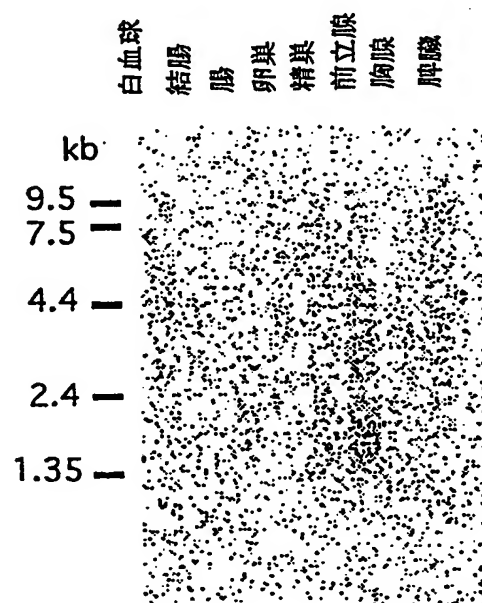
hBSSP-4



2/7

图 2

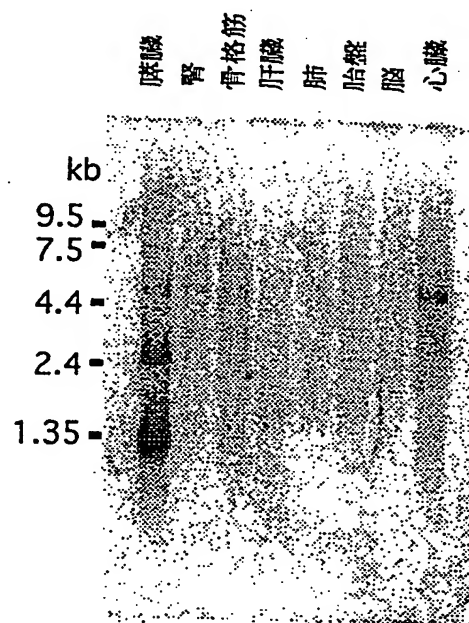
## hBSSP-4



1/7

図 1

# hBSSP-4



より、検体中のhBSSP4もしくはその断片を反応させ、生成したサンドイッチ錯体を検出する、検体中のhBSSP4もしくはその断片を測定する方法。

69. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、29、31、33、35、37または39のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に対して、標識化hBSSP4と検体中のhBSSP4もしくはその断片とを競合的に反応させ、抗体と反応した標識化hBSSP4の量から検体中のhBSSP4もしくはその断片の量を検出する、検体中のhBSSP4もしくはその断片を測定する方法。

70. 検体が体液である、請求項67～69のいずれか1つに記載の方法。

71. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質を含む、組織における、疾患の診断マーカー。

72. 脳における、アルツハイマー病、てんかんの診断に用いる請求項71記載のマーカー。

73. 脳、前立腺、胎盤、精巣または骨格筋における、癌、炎症の診断に用いる請求項71記載のマーカー。

74. 精子および精巣における不妊症の診断に用いる請求項71記載のマーカー。

75. 前立腺における前立腺肥大症の診断に用いる請求項71記載のマーカー。

60. BSSP4遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物。

61. BSSP4遺伝子がBSSP4をコードするcDNA、ゲノムDNAまたは合成DNAである請求項60記載のトランスジェニック非ヒト動物。

5 62. 遺伝子発現調節部位に変異を起こさせることにより発現レベルを変化させた請求項60記載のトランスジェニック非ヒト動物。

63. mBSSP4遺伝子の機能を欠損させたノックアウトマウス。

64. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、  
25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか  
10 1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体。

65. ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体またはペプチド抗体である請求項64記載の抗体。

66. ヒト以外の温血動物に請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41  
15 1または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片を投与し、抗体価の認められる該動物を選択し、脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することを含む、請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、  
20 39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体の製造方法。

67. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41または43のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対する抗体と、検体中の該タンパク質  
25 もしくはその断片との免疫学的な結合に基づいて、検体中の該タンパク質またはその断片を測定する方法。

68. 請求項1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、29、31、33、35、37または39のいずれか1つに記載のタンパク質またはその断片に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体と標識化抗体とに



ンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 11 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

5 51. 配列番号 13 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 13 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

52. 配列番号 15 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 15 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10 53. 配列番号 17 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 17 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

54. 配列番号 19 に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号 19 に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

15 55. 請求項 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44～54 のいずれか 1 つに記載の塩基配列を含むことを特徴とするベクター。

56. 請求項 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44～54 のいずれか 1 つに記載の塩基配列を発現可能に保持する形質転換細胞。

57. 請求項 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、30、32、34、36、38、40、45～53 のいずれか 1 つに記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生された hBSSP4 を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

25 58. 請求項 24、26、28、42、44 または 54 記載の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産生された mBSSP4 を採取することを特徴とするタンパク質の製造法。

59. 細胞が大腸菌、動物細胞または昆虫細胞である、請求項 57 または 58 のいずれか 1 つに記載の製造法。

つ配列番号20のアミノ酸番号-49~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

43. 配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸274個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

44. 配列番号19の塩基番号182~1003に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号-15~259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

45. 配列番号1に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号1に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

46. 配列番号3に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号3に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

47. 配列番号5に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号5に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

48. 配列番号7に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号7に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

49. 配列番号9に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、配列番号9に示す塩基配列がコードするタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

50. 配列番号11に示す塩基配列、または、これに相補的な塩基配列とストリ

～257に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号ー49～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

5       38. 配列番号5の塩基番号4～921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号ー49～257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号ー49～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

10       39. 配列番号6のアミノ酸番号ー15～257に示すアミノ酸272個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号ー15～257に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号ー15～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

15       40. 配列番号5の塩基番号106～921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号ー15～257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号ー15～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

20       41. 配列番号20のアミノ酸番号ー49～259に示すアミノ酸308個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号ー49～259に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号ー49～259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

25       42. 配列番号19の塩基番号80～1003に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号ー49～259に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、か

32. 配列番号1の塩基番号106～954に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号ー15～268に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号ー15～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

33. 配列番号4のアミノ酸番号ー49～270に示すアミノ酸319個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号ー49～270に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー49～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

34. 配列番号3の塩基番号4～960に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号ー49～270に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー49～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

35. 配列番号4のアミノ酸番号ー15～270に示すアミノ酸285個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号ー15～270に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー15～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

36. 配列番号3の塩基番号106～960に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号ー15～270に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号ー15～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

37. 配列番号6のアミノ酸番号ー49～257に示すアミノ酸306個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号ー49

27. 配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸15個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号15  
5 ～1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

28. 配列番号19の塩基番号182～226に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号15～1に示すアミノ酸配列を有するタンパ  
10 ク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

29. 配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸317個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号49  
15 ～268に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

30. 配列番号1の塩基番号4～954に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これら  
20 に相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号49～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

31. 配列番号2のアミノ酸番号15～268に示すアミノ酸283個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2のアミノ酸番号15  
25 ～268に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号15～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

いはこれらの修飾体または断片。

22. 配列番号1の塩基番号106～150に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

23. 配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸259個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

24. 配列番号19の塩基番号227～1003に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号1～259に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

25. 配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸34個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

26. 配列番号19の塩基番号80～181に示す塩基配列、配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

列番号 16 のアミノ酸番号 1 ～ 80 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

- 5 17. 配列番号 18 のアミノ酸番号 1 ～ 253 に示すアミノ酸 253 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 18 のアミノ酸番号 1 ～ 253 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 18 のアミノ酸番号 1 ～ 253 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

- 10 18. 配列番号 17 の塩基番号 151 ～ 909 に示す塩基配列、配列番号 18 のアミノ酸番号 1 ～ 253 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 18 のアミノ酸番号 1 ～ 253 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。

- 15 19. 配列番号 2 のアミノ酸番号 -49 ～ -16 に示すアミノ酸 34 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 2 のアミノ酸番号 -49 ～ -16 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸番号 -49 ～ -16 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体または断片。

- 20 20. 配列番号 1 の塩基番号 4 ～ 105 に示す塩基配列、配列番号 2 のアミノ酸番号 -49 ～ -16 に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号 2 のアミノ酸番号 -49 ～ -16 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列、あるいはこれらの断片。

- 25 21. 配列番号 2 のアミノ酸番号 -15 ～ -1 に示すアミノ酸 15 個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号 2 のアミノ酸番号 -15 ～ -1 に示すアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号 2 のアミノ酸番号 -15 ～ -1 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、ある

示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

- 5      12. 配列番号11の塩基番号151～396に示す塩基配列、配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
- 10     13. 配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸185個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あ
- 15     るいはこれらの修飾体。
14. 配列番号13の塩基番号151～705に示す塩基配列、配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号14のアミノ酸番号1～185に示すアミノ酸配列を有するタンパク質
- 20     と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
15. 配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸80個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号16のアミノ酸番号1～80に示す
- 25     アミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
16. 配列番号15の塩基番号151～390に示す塩基配列、配列番号16のアミノ酸番号1～80に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配



6. 配列番号5の塩基番号151～921に示す塩基配列、配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
- 5 7. 配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸97個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
- 10 8. 配列番号7の塩基番号151～441に示す塩基配列、配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号8のアミノ酸番号1～97に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
- 15 9. 配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸158個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
- 20 10. 配列番号9の塩基番号151～624に示す塩基配列、配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号10のアミノ酸番号1～158に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
- 25 11. 配列番号12のアミノ酸番号1～82に示すアミノ酸82個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号12のアミノ酸番号1～82に

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号2のアミノ酸番号1～268に示すアミノ酸268個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号2に示すアミノ酸配列において  
5 1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
2. 配列番号1の塩基番号151～954に示す塩基配列、配列番号2のアミノ酸番号1～268に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これ  
10 らに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号2のアミノ酸番号1～268に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
3. 配列番号4のアミノ酸番号1～270に示すアミノ酸270個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号4のアミノ酸番号1～270に  
15 示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。
4. 配列番号3の塩基番号151～960に示す塩基配列、配列番号4のアミノ酸番号1～270に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、または、  
20 これらに相補的な塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ配列番号4のアミノ酸番号1～270に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列。
5. 配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸257個から成るアミノ酸配列を有するタンパク質、または、配列番号6のアミノ酸番号1～257に  
25 示すアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ配列番号6のアミノ酸番号1～257に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と同等の性質を有するタンパク質、あるいはこれらの修飾体。

SEQ ID NO: 35: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F6 to amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (forward)

SEQ ID NO: 36: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R1 for RACE for human BSSP4 (reverse)

5 SEQ ID NO: 37: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R2 for RACE for human BSSP4 (reverse)

SEQ ID NO: 38: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R3/E to amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (reverse)

10 SEQ ID NO: 39: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R4/E to amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (reverse)

SEQ ID NO: 40: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4.1 for RACE for mouse BSSP4 (forward)

SEQ ID NO: 41: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F2 for RACE for mouse BSSP4 (forward)

15 SEQ ID NO: 42: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F3 to amplify full-length mouse BSSP4-encoding mRNA (forward)

SEQ ID NO: 43: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F4 to amplify mature mouse BSSP4-encoding region (forward)

20 SEQ ID NO: 44: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4.2 for RACE for mouse BSSP4 (reverse)

SEQ ID NO: 45: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4R2 for RACE for mouse BSSP4 (reverse)

SEQ ID NO: 46: Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4R3/P to amplify full-length mouse BSSP4-encoding mRNA (reverse)

25 SEQ ID NO: 47: Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

SEQ ID NO: 48: Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO: 21: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

5 SEQ ID NO: 22: Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

SEQ ID NO: 23: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

SEQ ID NO: 24: Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding sequence

10 SEQ ID NO: 25: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

SEQ ID NO: 26: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pSecTrypHis/Neurosin

15 SEQ ID NO: 27: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypHis

SEQ ID NO: 28: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypSigTag

SEQ ID NO: 29: Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pFBTrypSigTag

20 SEQ ID NO: 30: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

SEQ ID NO: 31: Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of serin proteases-encoding sequence; n is a, c, g or t.

25 SEQ ID NO: 32: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F1 for RACE for human BSSP4 (forward)

SEQ ID NO: 33: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F2 for RACE for human BSSP4 (forward)

SEQ ID NO: 34: Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F3 to amplify mature human BSSP4-encoding region (forward)

この培養上清中に得られた組換え融合タンパク質hBSSP4をキレートカラムに通し精製し、透析後、酵素活性を測定した。まず、培養上清をPBSバッファを用いてキレートカラム(Ni-NTA-Agarose, Qiagen社製)に供し、PBSにイミダゾール(和光純薬工業)を溶解した溶液で段階的に溶出した。得られたイミダゾール溶出分画を、さらにPD-10カラム(Pharmacia社製)でPBSバッファに交換した。このサンプル50 $\mu$ Lにエントロキナーゼ(1U/1 $\mu$ L, Invitrogen社製)10 $\mu$ Lを混和し、室温で60分反応させた。次に各種合成基質(ペプチド研究所: Boc-Gln-Ala-Arg-MCA、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA、Bz-Arg-MCA、Boc-Val-Leu-Lys-MCA、Pyr-Gly-Arg-MCA、Pro-Phe-Arg-MCA、Boc-Val-Pro-Arg-MCA、Z-Arg-Arg-MCA、Arg-MCA、Z-Phe-Arg-MCA)をDMSOに溶解し、1M Tris-HCl, (pH 8.0)で希釈した0.2M基質溶液を50 $\mu$ L加え、さらに、37 $^{\circ}$ Cで反応した。1時間後に励起波長380nm、蛍光波長460nmにおける、酵素作用に生じるAMC(7-アミノ-4-メチルクマリン)の蛍光を測定することにより、活性を測定した。

その結果、組換え融合タンパク質hBSSP4は、セリンプロテアーゼ活性を示すことが示された。また、マウス由来のmBSSP4についても同様に活性を有することが示された。

## 20 産業上の利用の可能性

本発明によって、単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ(hBSSP4およびmBSSP4)ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体および多形性変種が提供される。さらに、本発明によって、hBSSP4およびmBSSP4タンパク質ならびにhBSSP4およびmBSSP4ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含有する組成物、それらの製造方法および使用が提供される。

pTrypSigTagのトリプシノシグナル配列からエンテロキナーゼ認識部位までを配列番号24と28の配列を有するプライマーを用いたPCRによって作製したcDNAをBglIIとBamHI消化によって切り出し、pFastBAC1 (GIBCO) のBamHIサイトに挿入した。挿入方向を配列番号2  
5 4と29の配列を有するプライマーを用いたPCRによって確認し、polyhedrinプロモーターによって転写・翻訳される方向に挿入されたクローンを選択し、pFBTrypSigTagとした。

5  $\mu$ gのpFBTrypSigTagベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベーンヌクレアーゼ(宝酒造)を加えて室温(25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更  
10 に、20単位のEcoRIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase (宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

E. coli pTrcHis/hBSSP4 (受託番号FERM P-17037) から得られるpTrcHis/hBSSP4またはpCRII/hBSSP4より定法に従いPCRを行い、hBSSP4の活性体領域のcDNAを得  
15 た。得られたcDNAをpFBTrypSigTagに挿入しpFBTrypSigTag/hBSSP4を得た(図7B)。この際、塩基配列を決定することにより、正しくhBSSP4が挿入されているかを確認した。

pFBTrypSigTag/hBSSP4をGibco BRL BAC-TO-BAC  
20 baculovirus expression systemのプロトコールに従ってバクミドDNA上にTrypsinogen signal peptide、His tagおよびエンテロキナーゼ認識部位を融合したキメラhBSSP4を持つ組み換えバクミドを作製した。これをBAC-TO-BAC baculovirus expression systemのマニュアルに従いSf-9細胞で発現させたところ、ウィルス感染後2日目より培養上清中に分泌された。

25 E. coli pTrcHis/mBSSP4 (受託番号FERM P-17034) から得られるpTrcHis/mBSSP4または実施例1で得られたpCRII/mBSSP4を用いて、上記と同様にpFBTrypSigTag/mBSSP4を作製し、分泌させることができる。

## (2) 酵素活性の測定

i sをTAKARA ライゲーションキットを用いて挿入し、p S e c T r y p H i s /ニューロシンを得た (図6)。

5 配列番号25および26の配列を有するプライマーを用いてp S e c T r y p H i s /ニューロシンのトリプシンシグナルからエンテロキナーゼ認識部位までの部分にLeu-Val-His-GlyのペプチドがC末端にくるように増幅する。これをp S e c T a g 2 AのN h e IとH i n d IIIサイトに挿入しプラスミドp T r y p S i gを作製した。

10 プラスミドp S e c T a g 2 Aの1  $\mu$  g (0.1  $\mu$  l) を制限酵素N h e IおよびB a m H Iで処理することにより、I g G kのリーダー配列をコードする領域を完全に除去した。この溶液に対して、配列番号47および48の配列を有するDNAをそれぞれ100 p m o l eづつ加え、70℃で10分間熱処理した後室温で30分間放置してアニーリングした。N h e IとB a m H Iで処理したH i s分泌シグナル配列とp S e c T a g 2 A 1  $\mu$  lづつにDNAライゲーションキットV e r. 2 (宝酒造株式会社) のI液を2.0  $\mu$  l加え、16℃で、3  
15 0分間反応させた。

20 反応液に大腸菌コンピテントセルX L 1 - B l u e (STRATAGENE社) 0.1 m lを加え、氷上で30分間反応させた後、42℃で、60秒間熱ショックを与えた。2分間氷上に置いた後、S O C培地 (東洋紡績株式会社) を0.9 m l加え、37℃で、1時間シェーカーで振とう培養した。5,000 r p mで1分間遠心分離して、上清を廃棄した。遠心管内に残った溶液で沈殿したコンピテントセルを懸濁し、100  $\mu$  g / m lのアンプシリンを含むアンプシリンL Bプレートに播いた。37℃で、1晩培養し、生じたコロニーから得られたプラスミドのうち、H i s分泌シグナルのDNAが挿入されているものをP C Rで選択し、それをp T r y p H i sとした。

25 p T r y p H i sのH i s T a g領域を含むおよそ200 b pを配列番号26および27の配列を有するプライマーを用いて増幅し、H i n d IIIとB a m H Iによる消化で生じたH i s T a gとエンテロキナーゼ認識部位を含むおよそ40 b pの断片をp T r y p S i gに挿入してp T r y p S i g T a gを作製した (図7A)。

し、氷上で超音波処理を行うことで大腸菌を破壊し、14,000rpm、4℃で20分遠心して沈殿を得た。この沈殿物を0.5% Triton X-100を含む菌体破壊バッファーで2度洗浄し、Triton X-100を取り除くために水洗した後に8Mの尿素を含む変性バッファー (8M Urea、50 mM Tris pH8.5、20mM 2ME) で37℃で1時間浸透することで溶解した。この溶解液をTALON metal affinity resin (Clontech社製)に通し、10mMイミダゾール含有変性バッファーで洗浄後、100mMイミダゾール含有変性バッファーで溶出し、精製した。この精製物をPBSで一晩おきにバッファー交換しながら3日間透析し、タンパク質hBSSP4-HisおよびmBSSP4-Hisを得た。

実施例4 hBSSP4遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼ成熟タンパク質のpFBTrypSigTag/hBSSP4を用いた発現

(1) pFBTrypSigTag/hBSSP4の作製

配列番号21および22の配列を有するオリゴヌクレオチドをアニールさせてNheIとBamHI消化したフラグメントをNheI-BamHI消化したpSecTag2A (Invitrogen社製)に挿入し、pSecTrypHisとした。5μgのpSecTrypHisベクターに対して20単位のBamHIを加え、37℃で4時間かけて切断した後、6単位のマングベীনヌクレアーゼ (宝酒造)を加えて室温 (25℃)で30分間反応させて末端を平滑化した。更に、20単位のXhoIでクローニングサイトの3'側を切断した後、1単位のbacterial alkaline phosphatase (宝酒造)を加えて65℃で30分反応した。

特開平9-149790またはBiochim. Biophys. Acta, 1350, 11, 1997に記載されている方法に準じて、COLO201細胞よりmRNAを調製し、cDNAを合成し、プラスミドpSPORT/ニューロシンを得た。pSPORT/ニューロシンより、配列番号23および24の配列を有するプライマーを用いてPCRを行い、ニューロシン活性型領域のcDNAを得た。このPCR産物の3'側のXhoIサイトを10unitのXhoIで、37℃、3時間反応させることにより切断した。これと上記pSecTrypH



骨格筋において、本新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。さらに、上記ノザン・ブロット解析によって、配列番号7の塩基配列を有する転写物(約1.4~1.5 kb)の存在も確認された。

5 実施例3 hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子がコードする新規セリンプロテアーゼの発現

(1) 発現プラスミドの構築

10 プラスミドpCRII/hBSSP4またはpCRII/mBSSP4をテンプレートに、hBSSP4タンパク質またはmBSSP4タンパク質の成熟体タンパク質をコードするcDNA領域をPCR反応にて増幅した(使用したプライマーは、ヒトについては配列番号34および39の配列を有するプライマーであり、マウスについては配列番号43および46であったの配列を有するプライマーであった)。このPCR産物をそれぞれpTrc-HisB (Invitrogen) を

15 BamHIで消化後、マングベーン・ヌクレアーゼで平滑末端にしたものに常法通りにライゲーションし、大腸菌JM109を形質転換させ、生じたコロニーをPCR法にて解析して目的とするセリンプロテアーゼ発現プラスミドpTrcHis/hBSSP4およびpTrcHis/mBSSP4を含む大腸菌を得た。

20 得られた大腸菌は、それぞれE. coli pTrcHis/hBSSP4およびE. coli pTrcHis/mBSSP4と命名し、1998年10月29日より、受託番号FERM P-17037およびFERM P-17034の下、日本国茨城県つくば市東1丁目1-3 通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に委託してある。

(2) 発現プラスミドを含む大腸菌でのタンパク発現

25 発現プラスミドを持つ大腸菌のシングルコロニーを10 mlのLB (Amp+) 培地に接種し、一晚37℃で培養した。これを250 mlのLB (Amp+) 培地に接種し、37℃で培養した。600 nmの吸光度が0.5になった時、250 μlの0.1 M IPTG (イソプロピルーβ-D (-) チオガラクトピラノシド) を加え、更に5時間培養した。この大腸菌を遠心分離後、菌体破壊バッファー (10 mMリン酸バッファー pH7.5、1 mM EDTA) で懸濁

実施例2     h B S S P 4もしくはm B S S P 4遺伝子のヒトおよびマウス臓器での発現

B a l b / c マウスあるいはその胎児の各種臓器から、QuickPrep Micro mRNA purification Kit (Amersham-Pharmacia) のプロトコルに従い、mRNAを単離した。これらを常法通りに電気泳動し、ナイロンメンブランに転写した。このフィルターをp C R I I / m B S S P 4よりm B S S P 4の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T Pで標識したプローブを5×SSCで希釈したものと、65℃で一昼夜反応させた。同様に、human multiple tissue blot, human multiple tissue blot IIおよびhuman brain multiple blot II (Clontech社製) 膜をp C R I I / h B S S P 4の成熟体をコードする部分を単離・精製し、 $\alpha$ - $^{32}$ P d C T Pで標識したプローブを5×SSCで希釈したものと、65℃で一昼夜反応させた。その後、フィルターを2×SSC/0.1% SDSで室温30分間、1×SSC/0.1% SDSで室温30分間、0.1×SSC/0.1% SDSで65℃30分間で2回洗い、FLA 2000用イメージングプレート(富士フイルム社)に1日露光させ、解析した。human multiple tissue blot膜(図1)、human multiple tissue blot II膜(図2)、human brain multiple blot II膜(図3)、生後3ヶ月のマウスの各種臓器から調製したmRNA(図4)、生後1、3、12ヶ月のマウスの前立腺から調製したmRNA(図5)を用いた結果を示す。また、上記で作製したmRNAをReady To Go RT-PCR Beads (Amersham-Pharmacia) を用いてキット添付のプロトコル通りにh B S S P 4およびm B S S P 4について遺伝子特異的プライマー(ヒト: 配列番号33および38または39; マウス: 配列番号40および44)を用いてRT-PCRを行った。

ノザン・プロット解析の場合、図1～3に示すように、h B S S P 4は前立腺(図2、1.35～2.4 kbの間のバンド)および小脳(図3、1.35～2.4 kbの間のバンド)で発現を示し、m B S S P 4は前立腺および骨格筋で発現が認められた(図4)。またRT-PCRの結果、h B S S P 4は胎児から成人の脳、胎盤、精巣および前立腺で発現が認められ、m B S S P 4は新生児から成体マウスの前立腺で発現が認められた。ゆえに、脳、前立腺、胎盤、精巣および

		hBSSP4F2	Forward	TGAGGACATGCTGTGTGCCGG	RACE
					(配列番号 3 3)
		hBSSP4F3	Forward	GTTGTGGCGCGGAGGACAG	mature
					(配列番号 3 4)
5		hBSSP4F6	Forward	GCCATGGTGGTTTCTGGAGC	全長用
					(配列番号 3 5)
		hBSSP4R1	Reverse	TATGGTTTGTTCAGGTTGTCC	RACE
					(配列番号 3 6)
		hBSSP4R2	Reverse	AGGGCAATGTCTGCACAGGC	RACE
10					(配列番号 3 7)
		hBSSP4R3/E	Reverse	CTGAATTCCTAGGAGCGCGCGGCC	全長用
					(配列番号 3 8)
		hBSSP4R4/E	Reverse	GAGAATTCGATATGTGGGCAGGGTTACA	全長用
					(配列番号 3 9)
15	mouse BSSP4	mBSSP4.1	Forward	ACAAACCATCTCTGTTCTCAG	RACE
					(配列番号 4 0)
		mBSSP4F2	Forward	GTCCCAGAAAGTAGGCATTG	RACE
					(配列番号 4 1)
		mBSSP4F3	Forward	CTCCACCCATACCAGCAATG	全長用
20					(配列番号 4 2)
		mBSSP4F4	Forward	ATTGTGGGAGGTGAGGACAG	mature
					(配列番号 4 3)
		mBSSP4.2	Reverse	TGCAGAGTTCGGAGTCGATG	RACE
					(配列番号 4 4)
25		mBSSP4R2	Reverse	ATCCAGCAGTCGGTCTTGGG	RACE
					(配列番号 4 5)
		mBSSP4R3/P	Reverse	ATTCTGCAGTTCCTTGTCTCTCGCTCAGG	全長用
					(配列番号 4 6)

5 ～ 1 はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysおよびアミノ酸番号192～196に示すAsp-Ser-Gly-Gly-Proを有し、かつ、それらのコンセンサス配列間にAspが1カ所以上存在していた。

さらに、おそらくオルターナティブスプライシングに起因する異なる塩基配列を有する8種のクローンも得られた。これらのDNAの塩基配列を配列番号3、5、7、9、11、13、15および17に示す。さらに、これらの塩基配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号4、6、8、10、12、14、16および18に示す。上記のように、これらの中には、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列を有するものおよび有しないものが含まれている。これらの遺伝子産物（転写物または翻訳産物）はセリンプロテアーゼに対する調節因子などの機能を有している可能性がある。

同様の手順により下記のプライマーを使用し、mouse brain Marathon-Ready cDNA (Clontech社) を鋳型にして5' RACE、3' RACE法を行い、クローニングしてマウスの相同性のある遺伝子pCRII/mBSSP4を得た。このプラスミド中に含まれるDNAの塩基配列を配列番号19に、この塩基配列から推定されるmBSSP4タンパク質のアミノ酸配列を配列番号20に示す。配列番号20に示すmBSSP4（アミノ酸番号1～259）のアミノ酸配列はアミノ酸259個から成るmBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質である。配列番号20のアミノ酸配列において、アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、mBSSP4の前駆体と考えられる。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysおよびアミノ酸番号192～196に示すAsp-Ser-Gly-Gly-Proを有し、かつ、それらのコンセンサス配列間にAspが1カ所以上存在していた。

human BSSP4    hBSSP4F1    Forward   AGGTTCTATCATCGACTCG    RACE  
(配列番号32)

ー (ABI社) を用いてサイクルシーケンス法による塩基配列の決定を行った。  
得られた各クローンの配列をGenBankで相同性を調べ、未知であったク  
ローン、BSSP4遺伝子について5' RACE、3' RACE法によりcDNA  
全長を得、上記法と同じく塩基配列の決定を行った。すなわち、BSSP4ク  
5 ローン特異的プライマー、GSP1プライマー (hBSSP4F1 (配列番号32) または  
hBSSP4R1 (配列番号36) 、およびGSP2プライマー (hBSSP4F2 (配列番号3  
3) またはhBSSP4R2 (配列番号37) ) を作製し、human brain Marathon-Ready  
cDNA (Clontech社) を用いてこの試薬に付属するAP1プライマーと上記GSP  
1プライマーのいずれかで94℃、2分を1サイクル、94℃、30秒、60℃、  
10 30秒、72℃、30秒を35サイクルするPCRを行った。次に、このPCR  
産物を1/100に希釈したものを5μl、10×バッファーを5μl、dN  
TPを5μl、10μMの上記GSP2プライマーのいずれかを10pmol、  
試薬に付属するAP2プライマーを10pmol、ExTaqを0.5ユニット、  
滅菌水で全量を50μlとし、先と同様にPCRを行った。このPCR産物を上  
15 記TOPO TAクローニングキットを用いてクローニングし、シーケンスを  
行い前記クローンの上流、下流領域を得た。この際、タンパク質の全長をカバー  
していないと思われるクローンについては更に、新たに判明した塩基配列に基づ  
いて下記に示す特異的プライマーを作製した。またこの配列を基にしてORFを  
増幅できるような下記に示すプライマー (hBSSP4F6 (配列番号35) および  
20 hBSSP4R3/E (配列番号38) またはhBSSP4R4/E (配列番号39) ) を作製し、  
human brain Marathon-Ready cDNAを鋳型としてPCRを行い同一クローンであるこ  
とを確認し、これをTOPO TAクローニングキットに添付のpCRII-T  
OPOベクターにクローニングし、全長のcDNAクローンが入ったプラスミド  
pCRII/hBSSP4を得た。このプラスミド中に含まれるDNAの塩基配  
25 列を配列番号1に、この塩基配列から推定されるhBSSP4タンパク質のアミ  
ノ酸配列を配列番号2に示す。配列番号2に示すhBSSP4 (アミノ酸番号1  
～268) のアミノ酸配列はアミノ酸268個から成るhBSS4成熟型あるい  
は活性型タンパク質である。配列番号2のアミノ酸配列において、アミノ酸番号  
ー49～ー1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号ー1

他公知の架橋剤が利用可能である。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。また、抗体としては、場合によっては、そのフラグメント、例えばF a b'、F a b、F (a b')<sub>2</sub>を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体をアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば、更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、安定剤としてチメロサルもしくはグリセリン等を加えて、あるいは凍結乾燥して冷暗所に保存する。

- 10 測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、脳脊髄液等の体液等、h B S S P 4もしくはm B S S P 4またはその断片を含む試料もしくはこれらの前駆体またはその断片を含む試料であれば限定されない。

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

15

#### 実施例

##### 実施例1 新規セリンプロテアーゼのクローニング

- human brain cDNA library (Clontech社)を鋳型にして、プライマー配列1 ; GTG CTC ACN GCN GCB CAY TG (配列番号30) , 2; CCV CTR WSD CCN CCN GGC GA (配列番号31) に示すセリンプロテアーゼに共通のアミノ酸に対応する塩基配列のプライマーを用いたPCR法でクローニングを行った。すなわち鋳型を5  $\mu$  l、10 $\times$ ExTaqバッファーを5  $\mu$  l、dNTPを5  $\mu$  l、上記プライマーを各10 pmol、ExTaq (TAKARA社製)を0.5  $\mu$  l加え滅菌水で全量を50  $\mu$  lとし、94 $^{\circ}$ C、0.5分、55 $^{\circ}$ C、0.5分、72 $^{\circ}$ C、1分のサイクルで35回PCRを行った。このPCR産物をTOPO TAクローニングキット (Invitrogen社) 添付のpCR II-TOPOベクターと混ぜ、室温で5分間放置した。その後常法通りにキット添付の大腸菌Top 10に形質転換し、LB (Amp<sup>+</sup>) プレート (100  $\mu$  g/mlのアンピシリンを含有する) に播いた。得られた各コロニーから常法通りにプラスミド抽出し、蛍光シーケンサ
- 20
- 25

- ヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ等が挙げられ、蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オルト
- 5 フタルアルデヒド等が挙げられ、発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩およびその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン等が挙げられ、放射性物質としては $^{125}\text{I}$ 、 $^{127}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 等
- 10 が挙げられるが、これらに限らず免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。さらに、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサルまたはフルオレサミンの様な低分子ハプテンを結合させても良い。好ましくは西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができる。
- 15 標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤を用いる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として $\text{H}_2\text{O}_2$ を用い、発色剤として2, 2'-アジノージー [3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸] アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3, 3', 5, 5'-テトラ
- 20 ラメチルベンジジン等を使用することができ、酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用することができ、酵素に $\beta$ -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド、4-メチルウンベリフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド等を使用することが
- 25 できる。本発明には、また、前述のモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体および試薬類をキット化したのものも含まれる。

架橋剤としては、N, N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4, 4'-ジチオピリジン、その

5 の断片とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体-h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法もしくは固定化抗体、標識化抗体および h B S S P 4 もしくは m B S S P 4 またはその断片を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属等が挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

15 抗体の固層化には、公知の化学的結合法または物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートおよびN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる 2 種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第 3 の抗体を上記の方法で固層化させておいて捕捉することも可能である。

25 標識物質としては、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質および金属キレート等を使用するのが好ましい。酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌スクレアーゼ、デルター-5-ステロイドイソメラーゼ、 $\alpha$ -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボ



プテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカップリングさせる方法が用いられる。また、ハプテンとキャリアーのカップリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬などが用いられる。縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は、通常2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行われる。ポリクローナル抗体は上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水等、好ましくは血液から採取することができる。抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。

hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片に対するモノクローナル抗体ならびにポリクローナル抗体は、hBSSP4もしくはmBSSP4を発現している細胞に関連する疾病の診断や治療に利用することが可能である。これらの抗体を用いて、本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片との免疫学的な結合に基づき、hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定することができる。具体的には、これらの抗体を用いてhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定する方法としては、例えば、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識化hBSSP4もしくはmBSSP4と検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定する競合法を利用して検体中のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を測定する方法が挙げられる。

サンドイッチ法によるhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片の測定においては、まず、固定化抗体とhBSSP4もしくはmBSSP4またはそ

ノクローナル抗体は、本発明におけるhBSSP4もしくはmBSSP4特異的なモノクローナル抗体といえる。配列番号2および4に記載されたアミノ酸配列の間で保存されたアミノ酸配列を選べば、BSSP4ファミリーに共通のエピトープを選択することができる。あるいは各配列に特異的なアミノ酸配列を含む領域であれば、それぞれのタンパク質の識別が可能なモノクローナル抗体を選択することができる。

抗hBSSP4またはmBSSP4モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行うことができる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、硫酸沈殿法、イオン交換体（例えばDEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテインAもしくはプロテインG等の活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を施すことができる。精製過程において凝集物の形成や抗体価の低下を防止する目的で、例えばヒト血清アルブミンを0.05～2%の濃度で添加する。その他、グリシン、 $\alpha$ -アラニン等のアミノ酸類、特にリジン、アルギニンおよびヒスチジン等の塩基性アミノ酸、グルコースやマンニトール等の糖類または塩化ナトリウム等の塩類を添加しても良い。IgM抗体の場合、特に凝集しやすいことが知られているため、 $\beta$ -プロピオニラクトンおよび無水酢酸で処理しても良い。

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアタンパク質との複合体を作り、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行い、該免疫動物から本発明のタンパク質またはその断片に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行うことにより製造することができる。温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアタンパク質との複合体に関し、キャリアタンパク質の種類およびキャリアとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率よくできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させても良いが、例えばウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハ

上清液中に目的とする抗体が存在する場合は酵素反応が進行し基質溶液の色が変化する。

- 5 クローニングは、通常半固体アガー法や限界希釈法等のそれ自体公知の方法で行うことができ、具体的には前記の方法で目的とする抗体を産生するウェルを確認した後、クローニングを行いシングルクローンを得る。クローニング法としては、培養プレート1ウェルあたりに1個のコロニーが形成するようにハイブリドーマ細胞を希釈して培養する限界希釈法等を用いると良い。限界希釈法によるクローニングには、コロニー形成能と高めるために支持細胞を用いるか、インターロイキン6などの細胞増殖因子を添加しても良い。その他、FACSおよびシングルセルマニプレーション法を用いてクローニングすることができる。クローン化されたハイブリドーマを、好ましくは無血清培地中で培養し、至適量の抗体をその上清に加える。この様にして得られた単一のハイブリドーマは、フラスコや細胞培養装置を用いて大量培養を行うか、動物の腹腔内で培養する (J. Immunol. Meth., 53, 313, 1982) ことにより、モノクローナル抗体を得ることができる。
- 10 フラスコ内で培養を行う場合は、0～20%のFCSを含む細胞培養用培地 (IMDM、DMEM、RPMI 1640およびMEM等) を用いて行うことができる。動物の腹腔内で培養する場合は、細胞融合に使用した骨髓腫細胞の由来となった動物と同種、同系統の動物または胸腺欠損ヌードマウス等を使用することが好ましく、予めプリスタン等の鉱物油を投与してからハイブリドーマを移植する。
- 20 1～2週間後腹腔内に骨髓腫細胞が増殖し、モノクローナル抗体を含む腹水を得ることができる。

- 25 本発明によるモノクローナル抗体は、hBSSP4もしくはmBSSP4に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって、他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的にそのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも3以上のアミノ酸残基、望ましくは7～20アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すと言われている。従って、配列番号2および4のいずれかに記載されたアミノ酸から選択され、かつ連続する少なくとも3アミノ酸残基から成るアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモ

いられる) またはプロテインAを加え、固相に結合した抗hBSSP4またはmBSSP4抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素等で標識したhBSSP4またはmBSSP4を加え、固相に結合した抗BSSP4モノクローナル抗体を検出する方法等が挙げられる。

抗hBSSP4もしくはmBSSP4モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1~20%、好ましくは10~20%の牛胎児血清を含むRPMI培地、1~10%の牛胎児血清を含むGIT培地、またはハイブリドーマ培養用無血清培地等を用いることができる。培養温度は、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日~3週間、好ましくは1週間~2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行われる。

ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗hBSSP4もしくはmBSSP4抗体価の測定と同様にして測定できる。すなわち、測定方法としてはラジオイムノアッセイ (RIA) 法、酵素免疫測定法 (ELISA) 法、FIA (蛍光イムノアッセイ) 法、プラーク測定法、凝集反応法等を用いることができるが、以下に示すようなELISA法が好ましい。

#### 20 ELISA法によるスクリーニング

免疫抗原と同様の操作で調製したタンパク質をELISAプレートの各ウェルの表面に固定化する。次に、非特異的吸着を防止する目的で、BSA、MSA、OVA、KLH、ゼラチンもしくはスキムミルク等を各ウェルに固定化する。この各ウェルにハイブリドーマ培養上清液を添加し、一定時間放置し免疫反応を行わせる。PBS等を洗浄液として各ウェルを洗浄する。この洗浄液中には界面活性剤を添加することが好ましい。酵素標識二次抗体を添加し一定時間放置する。標識酵素としては、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ等を用いることができる。同じ洗浄液で各ウェルを洗浄後、使用した標識酵素の基質溶液を添加し酵素反応を行わせる。添加したハイブリドーマ培養

5 づつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびラットが好ましくは用いられる。ラットにはWistarおよびSD系ラット等が好ましく、マウスにはBALB/c、C57BL/6およびICR系マウス等が好ましく用いられる。

10 モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められる個体を選択し、最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することがで  
15 きる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化hBSSP4またはmBSSP4と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法(Nature, 256, 495, 1975)やその変法(J. Immunol. Method, 39, 285, 1980, Eur. J. Biochem., 118, 437, 1981, Nature, 285, 446, 1980)に従い実  
20 施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール(PEG)やセンダイウイルス等が挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。さらに融合効率を高めるために、適宜レクチン、ポリ-L-リジンもしくはDMSOを添加することもできる。

20 骨髓腫細胞としては例えばX-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1等が挙げられるが、好ましくはSP2/0が用いられる。用いられる抗体産生細胞(脾臓細胞)数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:20～20:1であり、PEG(好ましくはPEG1000～PEG6000)を10～80%程度の濃度で添加し、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗hBSSP  
25 4もしくはmBSSP4抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、hBSSP4もしくはmBSSP4抗原を直接または担体と共に吸着させた固相(例えば、マイクロプレート)にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体(細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用

の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。ES細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や桑実胚期に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホモ接合体マウスが作製できる。

10 相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして用いるPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明できる。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

20 本発明はまた、hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には例えば、配列番号2、4、6、18または20のいずれかに記載のアミノ酸配列を有するタンパク質またはその断片に対する抗体が含まれる。hBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片に対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ペプチド抗体）または抗血清は、本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片等を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

25 本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4またはその断片は、投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体または希釈剤、担体と共に温血動物に対して投与される。投与に際して抗体産生を高めるために、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与しても良い。投与は通常1～6週毎に1回

F L P リコンビナーゼ系等による *in vivo* における部位特異的遺伝子組換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

5        マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば、以下に示すようにして行われる。

      まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェ  
10        ニック動物が系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイントロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6 週齢）、交  
15        配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

      効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵子の雄性前核にイン  
20        ジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵子を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否かを、尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こった時のみに活性化  
25        するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により確認することができる。さらに、トランスジーンが発現を確認するため、ノザン法もしくは RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質またはその断片に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティングを行ってもよい。

      本発明のノックアウトマウスは、m B S S P 4 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術により任意

本発明においては、遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、付加および／または挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して上昇または下降するように人工的に修飾することができる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンスRNAを用いて特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトした動物、点突然変異DNAを導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。

本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む広義の意味に解する。本発明におけるトランスジェニック動物は、hBSSP4もしくはmBSSP4の機能あるいは発現調節の研究、ヒトにおいて発現している細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

トランスジェニック動物の作製方法は、位相差顕微鏡下で前核期卵子の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターまたはアデノウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵子に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵子に導入する精子ベクター法等が開発されている。

精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al., Cell, 57, 717, 1989）。あるいはバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系やサッカロマイセス・セレビシアエ（*Saccharomyces cerevisiae*）の



大腸菌もしくは酵母等が含まれる。

本発明のタンパク質は、それ自体、単離・精製・認識しやすいように組換え融合タンパク質として発現させることができる。組換え融合タンパク質とは目的タンパク質をコードする核酸配列により発現されたタンパク質のN末端側または／  
5 およびC末端側に適当なペプチド鎖を付加して発現させたタンパク質である。本明細書における組換えタンパク質とは、目的タンパク質をコードする核酸配列を本発明の発現ベクターに組み込み、発現された組換え融合タンパク質から目的タンパク質をコードする核酸由来でないアミノ酸配列を切断したものであり、実質的に本発明のタンパク質と同義語である。

10 上記発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、例えば、リボポリアミン法、DEAEーデキストラン法、ハナハン法、リポフェクチン法、リン酸カルシウム法によるトランスフェクション、マイクロインジェクションおよびエレクトロポレーション等の方法がある。

本発明は、上記したような本発明の塩基配列で形質転換した細胞を培養し、産  
15 生されたhBSSP4もしくはmBSSP4を採取する、hBSSP4もしくはmBSSP4の製造法にも関する。細胞の培養、タンパク質の分離、精製も、自体公知の方法によって行うことができる。

本発明は、また、本発明の新規なセリンプロテアーゼの阻害剤にも関する。阻  
害剤のスクリーニングは、候補化合物と接触させた酵素の活性を、候補化合物と  
20 接触させていない酵素の活性と比較する等の自体公知の方法により行うことができる。

本発明は、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物に関する。ここで、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子とは、hBSSP4もしくはmBSSP4をコードするcDNA、  
25 ゲノムDNAあるいは合成DNAを含む。また、遺伝子の発現には転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック非ヒト動物は、hBSSP4もしくはmBSSP4の機能あるいは発現調節の研究、hBSSP4もしくはmBSSP4が関与すると予想される疾患のメカニズム解明、医薬品のスクリーニング・安全性試験に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

4. 5、p cDNA3. 1、p S e c T a g 2、Novagen社製のpET、  
pBAC、Promega社製のpGEM、Stratagene社製のpBl  
uescript IIもしくはFarmacia社製のpGEX、pUC18/  
19、pFastBAC (GIBCO社製) 等、本発明のタンパク質を発現し得  
5 るベクターであれば特に限定されないが、好ましくは、実施例記載のpCRII  
-TOPOベクター、および、商業的に入手し得る発現ベクター、例えばpSe  
cTag 2Aベクター、pSecTag 2Bベクター (Invitrogen  
社) を用い、自体公知の方法で本発明のタンパク質の分泌に適した分泌シグナル  
核酸配列と、その3' 下流側に、Tag核酸配列、切断可能核酸配列および本発  
10 明の成熟体または活性型タンパク質をコードする核酸配列を挿入することができ  
るクローニング部位をこの順序に組み込んで構築したタンパク質発現ベクター  
(本願出願人による「タンパク質発現ベクターとその使用」についての同日付け  
特許出願明細書) を用いる。具体的には、分泌シグナルとして、トリプシンシグ  
ナル、Tag塩基配列としてポリヒスチジンをコードする塩基配列、切断可能塩  
15 基配列として、酵素特異的切断が可能なアミノ酸配列をコードする塩基配列であ  
る、アミノ酸配列A s p - A s p - A s p - A s p - L y s をコードする塩基配  
列 (当該アミノ酸配列はエンテロカイネースにより認識され、そのC末端部分に  
おいて、組換え融合タンパク質が切断される。) を用いることが好ましい。

さらに、本発明は上記したようなベクターによりこれらが保持する本発明の塩  
20 基配列を発現可能に保持する形質転換細胞を提供する。本明細書における形質転  
換細胞に用いる宿主細胞としては、好ましくは動物細胞および昆虫細胞であるが、  
本発明の発現ベクター中の目的タンパク質をコードする核酸配列を発現し、細胞  
外に分泌することが可能な全ての細胞 (微生物を含む) が挙げられる。

本明細書における動物細胞もしくは昆虫細胞としては、それぞれヒト由来の細  
25 胞、ハエもしくはカイコ由来の細胞が挙げられる。例えば、CHO細胞、COS  
細胞、BHK細胞、Vero細胞、ミエローマ細胞、HEK293細胞、HeLa  
細胞、Jurkat細胞、マウスL細胞、マウスC127細胞、マウスFM3  
A細胞、マウス繊維芽細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、S2、Sf9、Sf21、H  
igh Five<sup>TM</sup> (登録商標) 細胞等がある。本明細書における微生物とは、

5 するためのプローブを設定することができる。あるいは、これらの塩基配列を含むDNAやRNAを増幅するためのプライマーを設定することができる。与えられた配列をもとにプローブやプライマーを設定することは当業者が日常的に行っている。設定された塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを化学合成によって得  
10 ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、様々な形式のハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいはPCRの様な核酸の合成反応に利用することができる。プライマーに利用するオリゴヌクレオチドは少なくとも10塩基、好適には15～50塩基の長さとするのが望ましく、プローブに利用するオリゴヌクレオチドは100塩基から全長の長さであることが望ましい。

さらに、本発明が提供するhBSSP4もしくはmBSSP4のcDNA塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するhBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することも可能である。具体的には特開平6-181767号、J. Immunol., 155, 2477, 1995、Proc. Natl.  
15 Acad. Sci, USA., 92, 3561, 1995) 等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。本明細書中で言うプロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御するDNA領域を、エンハンサー領域とはイントロン、5'非翻訳領域、または3'非翻訳領域に存在する遺伝子の発現を増強するDNA領域を言う。

20 本発明はまた、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17または19に示す塩基配列、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18または20に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列、または、これらに類似する塩基配列を含むことを特徴とするベクターにも関する。ここで特定の塩基配列に類似する塩基配列とは、上記したストリンジェントな条件下で特定の塩基配列  
25 またはそれに相補的な塩基配列とハイブリダイズすることができ、かつその塩基配列によってコードされるタンパク質と同等の性質を有するタンパク質をコードする塩基配列である。

ベクターは例えば、Invitrogen社製のpBAD/His、pRSETA、pcDNA2.1、pTrcHis2A、pYES2、pBlueBac



アミノ酸80個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数240個から成る。アミノ酸番号-49~-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15~-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

5 配列番号18に示すhBSSP4（アミノ酸番号1~253）のアミノ酸配列はアミノ酸253個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数759個から成る。アミノ酸番号-49~-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15~-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

10 配列番号20に示す成熟型mBSSP4（アミノ酸番号1~259）のアミノ酸配列はアミノ酸259個から成るmBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数777個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1~数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49~-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15~-1はプロ部分であり、mBSSP4の前駆体と考えられる。

20 なお、一般に真核生物の遺伝子は多形現象を示すことが多く、この現象によって1個あるいはそれ以上のアミノ酸が置換される場合もあり、また、その場合であってもタンパク質の活性が保持される場合もある。ゆえに、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18または20のいずれかに示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものを用いて得られたタンパク質をコードする遺伝子は、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り全て本発明に含まれる。さらに、配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18または20のいずれかに示されるアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り全て本発明に含有される。改変とは、置換、欠失、付加および/または挿入を含むと解する。特に、配列番号2、4、6または20に示すhBSSP4もしくはmBSSP4成熟型タンパク質のN末端アミノ酸に数個のアミノ酸を付加あるいは欠失等の改変をさせ

配列番号6に示す成熟型hBSSP4（アミノ酸番号1～257）のアミノ酸配列はアミノ酸257個から成るhBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数771個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数个程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

配列番号8に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～97）のアミノ酸配列はアミノ酸97個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数291個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

配列番号10に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～158）のアミノ酸配列はアミノ酸158個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数474個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

配列番号12に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～82）のアミノ酸配列はアミノ酸82個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数246個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

配列番号14に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～185）のアミノ酸配列はアミノ酸185個から成るタンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数555個から成る。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

配列番号16に示すhBSSP4（アミノ酸番号1～80）のアミノ酸配列は

G l y - P r oは有していなかった。配列番号17に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号720の下流に配列番号17の塩基番号721～948を付加したものであり、配列番号1の塩基番号721以降が除去されたものである。

5 配列番号20に示したアミノ酸配列はマウス型タンパク質 (mBSSP4) であり、セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号1～259で示したポリペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すA l a - A l a - H i s - C y sおよびアミノ酸番号192～196に示すA s p - S e r - G l y - G l y - P r oを有し、かつ、それらのコンセンサス配列間にA s pが1カ所以上存在していた。このタンパク質  
10 をコードする塩基配列を配列番号19に示した。

本明細書中で言うプロ部分とはプロ体から活性型タンパク質を削除した部分を言い、プレ部分とはプレプロ体からプロ体を削除した部分を言い、プレプロ部分とはプレプロ体から活性型タンパク質を削除した部分を言う。

15 配列番号2に示す成熟型hBSSP4 (アミノ酸番号1～268) のアミノ酸配列はアミノ酸268個から成るhBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数804個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいは  
20 はプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

25 配列番号4に示す成熟型hBSSP4 (アミノ酸番号1～270) のアミノ酸配列はアミノ酸270個から成るhBSS4成熟型あるいは活性型タンパク質であり、それをコードする塩基配列は塩基数810個から成る。本発明者らは本成熟型タンパク質のアミノ酸配列中のN末端のアミノ酸1～数個程度を欠失または付加させてもセリンプロテアーゼ活性が保持されることを証明しているが、好ましくは本アミノ酸配列である。アミノ酸番号-49～-1はプレプロ部分あるいはプロ部分であり、また、アミノ酸番号-15～-1はプロ部分であり、hBSSP4の前駆体と考えられる。

号7に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号233～282が除去されたものである。

5 配列番号10に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、Ala-Ala-His-Cysは有していなかったが、アミノ酸番号82～86に示すAsp-Ser-Gly-Gly-Proは有していた。配列番号9に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号233～562が除去されたものである。

10 配列番号12に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysを有するが、Asp-Ser-Gly-Gly-Proは有していなかった。配列番号11に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号364～562が除去されたものである。

15 配列番号14に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysを有するが、Asp-Ser-Gly-Gly-Proは有していなかった。配列番号13に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号588～1145が除去されたものである。なお、配列番号13に示す塩基番号652以降の塩基配列が「ccc ggg ccc cag cgc ttt tgt gta tat aaa tgt taatgatttt tataggtatt tgtaacctg cccacatatc」であり、配列番号14に示す  
20 アミノ酸番号168以降のアミノ酸配列が「Pro Gly Pro Gln Arg Phe Cys Val Tyr Lys Cys」である可能性もある。

25 配列番号16に示したアミノ酸配列はヒト型(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysを有するが、Asp-Ser-Gly-Gly-Proは有していなかった。配列番号15に示した塩基配列は配列番号1の塩基番号285～562が除去されたものである。

配列番号18に示したアミノ酸配列はヒト型タンパク質(hBSSP4)であるが、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号39～42に示すAla-Ala-His-Cysを有するが、Asp-Ser-Gly-



BSSP 4) であり、セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号 1  
～268 で示したポリペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列  
として、アミノ酸番号 39～42 に示す Ala-Ala-His-Cys および  
アミノ酸番号 192～196 に示す Asp-Ser-Gly-Gly-Pro を  
5 有し、かつ、それらのコンセンサス配列間に Asp が 1 カ所以上存在していた。  
このタンパク質をコードする塩基配列を配列番号 1 に示した。

配列番号 4 に示したアミノ酸配列を有するタンパク質はヒト型タンパク質 (h  
BSSP 4) であり、セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号 1  
～270 で示したポリペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列  
10 として、アミノ酸番号 39～42 に示す Ala-Ala-His-Cys および  
アミノ酸番号 192～196 に示す Asp-Ser-Gly-Gly-Pro を  
有し、かつ、それらのコンセンサス配列間に Asp が 1 カ所以上存在していた。  
このタンパク質をコードする配列番号 3 に示した塩基配列は配列番号 1 に示した  
塩基番号 943～1217 が除去され、配列番号 4 に示したアミノ酸配列は配列  
15 番号 2 に示したアミノ酸配列とアミノ酸番号 265 以降が異なったものである。

配列番号 6 に示したアミノ酸配列はヒト型タンパク質 (hBSSP 4) であり、  
セリンプロテアーゼ活性を有する成熟型はアミノ酸番号 1～257 で示したポリ  
ペプチドである。セリンプロテアーゼのコンセンサス配列として、アミノ酸番号  
39～42 に示す Ala-Ala-His-Cys およびアミノ酸番号 192～  
20 196 に示す Asp-Ser-Gly-Gly-Pro を有し、かつ、それらの  
コンセンサス配列間に Asp が 1 カ所以上存在していた。このタンパク質をコー  
ドする配列番号 5 に示した塩基配列は配列番号 1 の塩基番号 895～1208 が  
除去され、配列番号 6 に示したアミノ酸配列は配列番号 2 に示したアミノ酸配列  
のアミノ酸番号 249 以降が異なったものであり、さらに、配列番号 1 に示した  
25 塩基番号 1282 の下流に配列番号 5 の塩基番号 969～1036 を付加したも  
のである。

配列番号 8 に示したアミノ酸配列はヒト型 (hBSSP 4) であるが、セリン  
プロテアーゼのコンセンサス配列は有していなかった。しかし、mRNA での発  
現は確認されているので、何らかの役割を有しているものと考えられる。配列番

はcDNAから成るハイブリッドのmRNA鎖を、例えばイー・コリ (E. coli) RNase H、イー・コリDNAポリメラーゼ1、イー・コリDNAリガーゼで処理し、DNA鎖に変換することにより、二本鎖cDNAを得ることができる。

- 5        hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、hBSSP4もしくはmBSSP4発現細胞ポリ(A)+RNAを鋳型にしてRT-PCR法によりクローニングすることも可能である。また、PCRによらず、hBSSP4もしくはmBSSP4遺伝子塩基配列をもとにプローブを作製・合成し、直接cDNAライブラリーをスクリーニングし、目的とするcDNAを得ることもできる。本発明の遺伝子を、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより選択することができる。本発明の遺伝子は、例えばホスホイミダイト法 (Mattenczi, M. D. et al., J. Am. Chem. Soc., 130, 3185, 1981) 等の核酸化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

- 10        上記のようにして得られたhBSSP4またはmBSSP4遺伝子を用いて、各種組織におけるこれらの発現を調べることができる。

- ノザン・プロット解析の場合、hBSSP4は小脳および前立腺で発現を示し、mBSSP4は前立腺および骨格筋で発現が認められた。RT-PCR解析の場合においては、hBSSP4は胎児から成人の脳、胎盤および前立腺で発現が認められ、mBSSP4は生後12日目の脳および胎盤で発現が認められた。ゆえに、脳、前立腺、胎盤および骨格筋において、本発明の新規セリンプロテアーゼが様々な役割を担っていると予想される。例えば、脳においてはアルツハイマー病 (AD)、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、また、その他の組織においては癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。その他に血液凝固・線溶・補体系にも何らかの影響を及ぼしていると予想できる。

- 20        ヒト新規セリンプロテアーゼ (hBSSP4) はmRNAのオルターナティブスプライシングにより9種のタンパク質から成っていた。

25        配列番号2に示したアミノ酸配列を有するタンパク質はヒト型タンパク質 (h

配列番号が示すアミノ酸配列には、上記に示した種々のその断片、類似するアミノ酸配列、またはこれらの断片、もしくはこれらの修飾体を含むものとする。また、本明細書において、特記しなき限り、BSSP4、hBSSP4、mBSSP4には、上記に示した各アミノ酸配列を有するタンパク質を含むものとする。

5

#### 図面の簡単な説明

図1：human multiple tissue blot膜を用いたノザンブロットの結果を示す。

図2：human multiple tissue blot II膜を用いたノザンブロットの結果を示す。

10 図3：human brain multiple blot II膜を用いたノザンブロットの結果を示す。

図4：実施例2において調製したmRNAを用いたノザンブロットの結果を示す。

図5：実施例2において調製したmRNAを用いたノザンブロットの結果を示す。

15 図6：実施例4の方法により構築したプラスミド。

図7：実施例4の方法によるプラスミドの構築図。

#### 発明の詳細な説明

本発明のhBSSP4もしくはmBSSP4をコードする塩基配列は、該タンパク質を発現している細胞からmRNAを調製して、常法により二本鎖DNAに変換して得ることができる。mRNAの調製にはグアニジンイソチオシアネート・塩化カルシウム法 (Chirwin, et al., Biochemistry, 18, 5294, 1979) 等を用いることができる。全RNAからのポリ(A)+RNAの調製はオリゴ(dT)を結合した担体、例えばセファロースあるいはラテックス粒子等を用いたアフニティークロマトグラフィー等を用いて行うことができる。上記のごとくして得られたRNAを鋳型にして、3'末端に存在するポリ(A)鎖に相補的なオリゴ(dT)またはランダムプライマーあるいはhBSSP4もしくはmBSSP4のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理し、この様にして得られたmRNAに相補的なDNAもしくは

20

25

ミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の別の態様は、配列番号4に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1～270）のN末端側に、配列番号4に示す－49から－1までの49個のアミノ酸もしくは－15から－1までの15個のアミノ酸が付加された、  
5 アミノ酸319個もしくは285個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号3、塩基番号4～960もしくは塩基番号106～960）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

10 本発明の別の態様は、配列番号6に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1～257）のN末端側に、配列番号6に示す－49から－1までの49個のアミノ酸もしくは－15から－1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸306個もしくは272個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号5、塩基番号4～921もしくは塩基番号106～  
15 921）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

本発明の別の態様は、配列番号20に示す成熟体mBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1～259）のN末端側に、配列番号20に示す－49から－1  
20 までの49個のアミノ酸もしくは－15から－1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸308個もしくは274個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号80～1003もしくは塩基番号182～1003）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。  
25 さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

また本発明は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17および19に示す塩基配列、ならびにこれらに類似する塩基配列にも関する。

以下、本明細書において、特記しない限り、各配列番号が示す塩基配列には、上記に示した種々のその断片、類似する塩基配列またはこれらの断片を含み、各

に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

さらに、配列番号2のアミノ酸番号-15～-1に示す15個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号106～150）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

また、配列番号20のアミノ酸番号1～259に示す259個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号227～1003）である。また、本発明には、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号20のアミノ酸番号-49～-16に示す34個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号80～181）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

さらに、配列番号20のアミノ酸番号-15～-1に示す15個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号19、塩基番号182～226）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体および断片も含む。

本発明の別の態様は、配列番号2に示す成熟体hBSSP4アミノ酸配列（アミノ酸番号1～268）のN末端側に、配列番号2に示す-49から-1までの49個のアミノ酸もしくは-15から-1までの15個のアミノ酸が付加された、アミノ酸317個もしくは283個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号4～954もしくは塩基番号106～954）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのア

ミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号10のアミノ酸番号1～158に示す158個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号9、塩基番号151～624）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号12のアミノ酸番号1～82に示す82個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号11、塩基番号151～396）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号14のアミノ酸番号1～185に示す185個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号13、塩基番号151～705）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号16のアミノ酸番号1～80に示す80個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号15、塩基番号151～390）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号18のアミノ酸番号1～253に示す253個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号17、塩基番号151～909）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号2のアミノ酸番号49～16に示す34個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号1、塩基番号4～105）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。

する cDNA のクローニングに成功した。

本発明の一つの態様は生物学的に活性な、成熟体セリンプロテアーゼ h B S S P 4 および m B S S P 4 アミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列である。

- 5       すなわち、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 ～ 2 6 8 に示す 2 6 8 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 1、塩基番号 1 5 1 ～ 9 5 4）である。また、本発明には、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのアミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。あるアミノ酸
- 10       配列に実質的に類似するアミノ酸配列とは、各アミノ酸配列を有するタンパク質が同等の性質を有する範囲内で該アミノ酸配列に 1 もしくは数個のアミノ酸の置換、欠失、付加および／または挿入等の修飾を施したアミノ酸配列をいう。タンパク質の修飾体には、例えば、リン酸付加体、糖鎖付加体、金属付加体（カルシウム付加体など）、他のタンパク質、例えばアルブミン等との融合体、またはタンパク質の二量体等が含まれる。
- 15

- さらに、配列番号 4 のアミノ酸番号 1 ～ 2 7 0 に示す 2 7 0 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 3、塩基番号 1 5 1 ～ 9 6 0）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらの
- 20       アミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

- さらに、配列番号 6 のアミノ酸番号 1 ～ 2 5 7 に示す 2 5 7 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 5、塩基番号 1 5 1 ～ 9 2 1）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらの
- 25       アミノ酸配列を有するタンパク質の修飾体も含む。

さらに、配列番号 8 のアミノ酸番号 1 ～ 9 7 に示す 9 7 個から成るアミノ酸配列および該アミノ酸配列をコードする塩基配列（配列番号 7、塩基番号 1 5 1 ～ 4 4 1）である。また、実質的に該配列に類似するアミノ酸配列および実質的に該配列に類似するアミノ酸配列をコードする塩基配列も含む。さらにこれらのア

コラゲナーゼ等が知られている。

現在我が国の死因の第一位を占める癌で、年間20万人以上が死亡している。ゆえに、癌の診断および治療もしくは予防の目印となる特異物質の研究が精力的に行われている。この特異物質を腫瘍マーカーもしくは腫瘍マーカー関連バイオマーカーと名付けている。これらは癌の治療前診断補助、発生臓器および病理組織型の推定、治療効果のモニタリング、再発の早期発見や予後の予測等に利用され、現在では腫瘍マーカーを用いる検査は臨床に不可欠の検査となっており、中でも肝細胞癌やヨークサック腫瘍に特異性が高いアルファ胎児タンパク (AFP) (Taketa, K. et al. ; Tumour Biol., 9, 110, 1988) および癌胎児性タンパク抗原 (CEA) は世界中で広く利用されている。将来、腫瘍マーカーの必要性は益々高まり、信頼性の高い癌の血清学的診断法に有用な臓器特異的マーカー、腫瘍細胞種特異的マーカー等の開発が期待されている。現在までにヒト前立腺上皮細胞で発現しているセリンプロテアーゼであるヒト腺性カリクレイン (hK2) は前立腺癌のマーカーとして有用であることが報告されている。また、hK2は前立腺特異的抗原 (PSA) の配列と78%の相同性を有しており、PSAも前立腺癌の生化学的マーカーとして広く使用されている (Mikolajczyk, S. D. et al. ; Prostate, 34, 44, 1998, Pannek, J. et al. ; Oncology, 11, 1273, 1997, Chu, T. M. et al. ; Tumour Biology, 18, 123, 1997, Hsieh, M. et al. ; Cancer Res., 57, 2651, 1997)。

#### 発明の目的

ゆえに、本発明の主な目的は、脳、前立腺、胎盤および骨格筋等の各種組織において、アルツハイマー病 (AD)、てんかん、癌、炎症、不妊症、前立腺肥大症をはじめとする各種疾患の治療および診断に利用できる可能性があり、さらに、現在用いられている診断マーカーに取って代わる、優れたマーカーとなり得る新規セリンプロテアーゼを提供することである。

#### 発明の要旨

この様な状況の中、我々はヒトおよびマウス新規セリンプロテアーゼをコード



の、あるいは発症前のADの検出という将来的に重要な役割が期待されている。さらに、同一の診断マーカーを用いることにより、異なる施設間の比較研究も可能となる。したがって、生物学的診断マーカーの開発は、多くのAD研究領域の中でも、最も重要な領域として認識され、将来への展望が期待されている。現在までに行われてきた診断マーカー開発へのアプローチは、ADを特徴付ける病理学的変化である老人斑や神経原線維変化の構成成分からのアプローチと、それ以外の物からのアプローチに大別される。前者として脳脊髄液タウタンパク質、A $\beta$ およびその前駆体タンパク質である $\beta$ APP、後者として抗コリン剤による瞳孔散大試験、Apo Eおよび他のAD関連遺伝子があるが良好な結果は得られていない。

セリンプロテアーゼは、癌細胞においても重要な役割を担っていると考えられる。癌を外科的にあるいは局所的放射線照射で根絶することが困難である理由は、癌に転移能力があるからである。固形腫瘍細胞が体内に広がるには、本来隣接していた細胞との接着をゆるめて、本来の組織から離れ、他の組織の中を通り血管もしくはリンパ管に到達し、基底層と管の内皮層を抜けて循環系に入り、体のどこかで循環系から出て、新しい環境中で生存し、増殖しなければならない。各種癌腫での隣接する上皮細胞との接着性は、上皮の細胞間接着分子であるカドヘリンが発現されなくなると失われるが、組織の突破は細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素に依存すると考えられている。

マトリックスを分解する酵素として主に金属プロテアーゼ (Rha, S. Y. et al. ; Breast Cancer Research Treatment, 43, 175, 1997) とセリンプロテアーゼがある。これらは共同してコラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンのようなマトリックスタンパク質を分解する。特に今まで知られているセリンプロテアーゼの中でマトリックスの分解に関与するものとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター (U-PA) がある。U-PAはタンパク分解連鎖反応に特異的な引き金の役割を持つ。その直接の標的はプラスミノゲンで、これは血中に豊富に存在し、傷や腫瘍および炎症部位などの組織の再構築部位に蓄積する不活性なセリンプロテアーゼの前駆体である。その他に、癌の転移・浸潤に関与しているプロテアーゼとして組織因子、ライソゾーム系の加水分解酵素および

療に有用である可能性がある。例えば、脳においてはアルツハイマー病（AD）、てんかん、脳腫瘍等の脳疾患の治療および診断に利用できる可能性がある。

ADの臨床診断は今日、DSM-III-RおよびNINCDS-ADRDAの診断基準（McKhann, G. et al. ; Neurology, 34, 939, 1994）または、DSM-IVの診断基準（American Psychiatric Association ; Diagnostic and statistical manuals of mental disorders, 4th ed, Washington DC, American Psychiatric Association, 1994）に基づいて一般的に行われている。しかし、これらの診断基準は、日常生活や社会生活上重大な支障を引き起こすほどの認知機能の低下を条件としているため、患者一人一人の社会生活のレベル、さらに診断に当たる医師の専門性、経験にも左右され得るものであり、科学的客観性に乏しいことが指摘されている。また、アルツハイマー病の確定診断は、病理組織学的検索によりなされるわけであるが、臨床診断と剖検診断との不一致も少なからず指摘されている。

現在、アルツハイマー病の臨床診断では補助的手段として画像診断も用いられるようになり、PETやSPECTにより海馬、大脳皮質の頭頂葉等の特異的な部位においてアルツハイマー病に特異的な代謝の低下、萎縮を初めとする脳機能の検査が可能となった。しかしながら、頭頂葉から側頭葉にかけての血流低下によりアルツハイマー病を確定するのは極めて危険である。また、MRS検査では、アルツハイマー病を含む痴呆患者に関して有用である報告は殆どない。さらに、CT・MRI画像診断も用いられているが、脳の萎縮やPVL等の白質病巣はアルツハイマー型痴呆に特異的ではなく、脳萎縮は年齢と共に進行することが報告されており、必ずしもアルツハイマー型痴呆に対して前記所見が見られるとは限らない。また、MRIは磁場強度や装置の性能または撮影条件により得られる画質が異なるため、異なる施設間で数値的比較ができるのは萎縮性変化のみである。また、血管性痴呆でも脳室拡大を認め得るし、脳底動脈領域の虚血後に海馬の萎縮を認める症例も存在する。

生物学的診断マーカーの開発は、この様な経緯の中からADの臨床診断に、より正確な客観性を与えるものとして多くの研究者から求められてきたと同時に、1) AD治療薬の客観的な効果判定システム、2) ADの診断基準を満たす以前

持ち、N末端近くには塩基性アミノ酸残基を有している。分泌シグナルはシグナルペプチドと同義語である。また、ある種のタンパク質は不活性前駆体（プロ体）のN末端にさらに分泌シグナルが結合しているものも存在し、このようなタンパク質をプレプロタンパク質（プレプロ体）という。

- 5       例えば、トリプシンはアミノ酸に翻訳された直後はプレプロ体として存在し、細胞外に分泌された後はプロ体として存在し、十二指腸でエンテロペプチダーゼもしくはトリプシン自体により限定加水分解されて活性型トリプシンとなる。

- 10       セリンプロテアーゼの至適pHは、中性から弱アルカリ性で、分子量は一般に30,000以下の場合が多い。分子量の大きい血液凝固・線溶・補体系プロテアーゼは、すべてトリプシン様セリンプロテアーゼに属しており、これらは多くの調節ドメインを持ち、生体反応において極めて重要なプロテアーゼカスケードを形成している。

- 15       最近、セリンプロテアーゼのコンセンサス配列に対するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたPCRにより多くの新規プロテアーゼのcDNAおよびアミノ酸配列が決定されている。この方法により、Yamamuraら (Yamamura, Y. et al. ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 239, 386, 1997)、Gschwendら (Gschwend, T. P. et al. ; Mol. Cell. Neurosci., 9, 207, 1997)、Chenら (Chen, Z-L. et al. ; J. Neurosci., 15, 5088, 1995) およびその他の多数の研究者が新規セリンプロテアーゼを発見している。

- 20       特開平9-149790号の配列番号3には新規セリンプロテアーゼであるニューロシン (Neurosin) が開示されており、また NeurosinはBiochimica et Biophysica Acta, 1350, 11-14, 1997にも報告されている。これによりセリンプロテアーゼ遺伝子を用いてニューロシンを大量に生産する方法および該酵素を用いる特異的阻害物質のスクリーニング方法が提供される。また、当該スクリーニング方法は、各種疾患治療剤の探索に有用であることも示されている。
- 25

ニューロシンのように脳・神経系で発現されるセリンプロテアーゼは脳・神経系において種々の役割を果たしていると考えられる。従って、脳・神経系において発現されている新規プロテアーゼをコードする遺伝子の単離およびこの遺伝子を使用したタンパク質の生産は、脳・神経系に関連する各種疾患の診断および治

## 明 細 書

## 新規セリンプロテアーゼBSSP4

5 発明の分野

本発明は単離されたヒトおよびマウスのセリンプロテアーゼ（本明細書において各々「hBSSP4」および「mBSSP4」と称し、両者を区別しない場合は単に「BSSP4」とする。）ポリヌクレオチド、それらの相同体、成熟体、前駆体、変異体および多形性変種ならびにそれらの検出方法に関する。さらには、  
10 hBSSP4およびmBSSP4タンパク質ならびにhBSSP4およびmBSSP4ポリヌクレオチドおよびタンパク質を含む組成物、それらの製造方法および使用に関する。

発明の背景

15 プロテアーゼは、一般に不活性前駆体として生合成され、分子内で限定加水分解を受け活性型プロテアーゼへ変換される。プロテアーゼである限りペプチド結合を加水分解する作用を有するが、種類によってその作用様式は極めて異なる。プロテアーゼはその触媒基の種類により、セリンプロテアーゼおよびシステインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼに分類される。  
20 各種のプロテアーゼは消化性を有するものから、様々な調節ドメインを持ち基質特異性が厳密で固有のタンパク質のみを特異的に加水分解するものまで、それらの性質は多彩である。

翻訳後のタンパク質に対しても様々なプロセッシングが行われ、活性型タンパク質が作られる。多くの分泌タンパクは、まず、活性型タンパク質のN末端に通常15～60個程度のアミノ酸残基から成る分泌に関与するペプチド（分泌シグナル）を付けた不活性前駆体型（プロ体）として細胞質内のリボソーム上で合成される。このペプチド部分は細胞膜を通過する機構に関連しており、ほとんどの場合、膜を通過する際に特異的なプロテアーゼで切断・除去され、成熟型タンパク質となる。分泌シグナルは中央部に疎水性アミノ酸から成る広い疎水性領域を

25

(57)要約

配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18 および 20 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、これらのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸からなるタンパク質、これらをコードする塩基配列を提供する。さらに、BSSP4の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト動物、BSSP4に対する抗体、該抗体を用いる検体中のBSSP4の検出方法を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		



<b>(51) 国際特許分類7</b> <b>C12N 15/57, 9/50, C07K 14/47, C12P</b> <b>21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N</b> <b>33/53</b>	<b>A1</b>	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO00/31277</b>  <b>(43) 国際公開日</b> <b>2000年6月2日(02.06.00)</b>
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP99/06472  <b>(22) 国際出願日</b> 1999年11月19日(19.11.99)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平10/347813 1998年11月20日(20.11.98) JP  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 扶桑薬品工業株式会社 (FUSO PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者 ; および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ)</b> 植村英俊(UEMURA, Hidetoshi)(JP/JP) 〒664-0883 兵庫県伊丹市南鈴原3丁目133 Hyogo, (JP) 奥井 文(OKUI, Akira)(JP/JP) 〒639-1123 奈良県大和郡山市筒井町569-1 コーポ陸603号 Nara, (JP) 小南勝也(KOMINAMI, Katsuya)(JP/JP) 〒599-0212 大阪府大阪市自然田786-2 Osaka, (JP) 山口 希(YAMAGUCHI, Nozomi)(JP/JP) 〒603-8146 京都府京都市北区鞍馬口通り寺町西入ル 新御霊口町285-79 Kyoto, (JP)	三井真一(MITSUI, Shinichi)(JP/JP) 〒606-8267 京都府京都市左京区北白川西町86 北白川コーポラス202号 Kyoto, (JP) <b>(74) 代理人</b> 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54) Title: NOVEL SERINE PROTEASES BSSP4</b>  <b>(54) 発明の名称</b> 新規セリンプロテアーゼBSSP4  <b>(57) Abstract</b> Proteins having the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 or proteins having amino acid sequences derived from the above sequences by deletion, substitution or addition of one or several amino acids therein; base sequences encoding the same; transgenic non-human animals having varied BSSP4 expression levels; an antibody against BSSP4; and a method for detecting BSSP4 in a specimen by using the antibody.		

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項は次の発明群に分けられる。

- ・ 1-18, 23, 24, 29-54 (55-59) (64-75)  
: 成熟型蛋白もしくはその一部を含む配列
- ・ 19, 20, 25, 26 (55-59) (64-75) : プレ配列
- ・ 21, 22, 27, 28 (55-59) (64-75) : プロ配列
- ・ 60-62 : トランスジェニック動物
- ・ 63 : ノックアウトマウス

各発明群は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO, 99/35170, A2 (Genentech INC.) 15. 7月. 1999 (15. 07. 99) ファミリーなし	1 - 7 5
P X	WO, 99/14328, A2 (Genentech INC.) 25. 3月. 1999 (25. 03. 99) ファミリーなし	1 - 7 5



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06472

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/57, C12N 9/50, C07K 14/47, C12P 21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N 33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N 15/57, C12N 9/50, C07K 14/47, C12P 21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO, 98/36054, A1 (AMRAD OPERATIONS PTY. LTD.) 20. 8月. 1998 (20. 08. 98) ファミリーなし	1-18, 23, 24, 29-59, 64-75 /60-63
Y	EP, 828003, A (SmithKline Beecham PLC.) 11. 3月. 1998 (11. 03. 98) & JP, 10-117789, A	60-62
Y	JP, 10-146188, A (株式会社エイジーン研究所) 2. 6月. 1998 (02. 06. 98) ファミリーなし	63

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 01. 00

国際調査報告の発送日

08.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4 N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06472

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims are classified into the following groups:

- claims 1 to 18, 23, 24, 29 to 54 (55 to 59), (64 to 75): sequences containing matured proteins or parts thereof;
- claims 19, 20, 25, 26 (55 to 59), (64 to 75): presequences;
- claims 21, 22, 27, 28 (55 to 59), (64 to 75): prosequences;
- claims 60 to 62: transgenic animals; and
- claim 63: a knockout mouse.

These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06472

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/57, C12N 9/50, C07K 14/47, C12P 21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/57, C12N 9/50, C07K 14/47, C12P 21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO, 98/36054, A1 (AMRAD OPERATIONS PTY.LTD.), 20 August, 1998 (20.08.98) (Family: none)	1-18, 23, 24, 29-59, 64-75 /60-63
Y	EP, 828003, A (SmithKline Beecham PLC.), 11 March, 1998 (11.03.98) & JP, 10-117789, A	60-62
Y	JP, 10-146188, A (Eijin Kenkyusho K.K.), 02 June, 1998 (02.06.98) (Family: none)	63
PX	WO, 99/35170, A2 (Genentech INC.), 15 July, 1999 (15.07.99) (Family: none)	1-75
PX	WO, 99/14328, A2 (Genentech INC.), 25 March, 1999 (25.03.99) (Family: none)	1-75

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 January, 2000 (27.01.00)

Date of mailing of the international search report  
08 February, 2000 (08.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 48

GAATTCGGAT CCTTGCATC GTCGTCATGG TGATGGTGAT GGTGAAAGGG GGCAGCAACA 60  
GCAGCAGCAA CAAAGGTAAG GATCAGGAGT AGATTCATGG TGTGCTAGC CAAGCTT 117

&lt;400&gt; 45

atccagcagt cggctcttggg

20

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4R3/P to  
amplify full-length mouse BSSP4-encoding mRNA (reverse)

&lt;400&gt; 46

attctgcagt tccttgttct ctcgctcagg

30

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

&lt;400&gt; 47

AAGCTTGGCT AGCAACACCA TGAATCTACT CCTGATCCTT ACCTTTGTIG CTGCTGCTGT 60  
TGCTGCCCCC TTTCACCATC ACCATCACCA TGACGACGAT GACAAGGATC CGAATTC 117

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; DNA

42/44

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F4 to amplify mature mouse BSSP4-encoding region (forward)

&lt;400&gt; 43

attgtgggag gtgaggacag

20

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4.2 for RACE for mouse BSSP4 (reverse)

&lt;400&gt; 44

tgcagagttc ggagtcgatg

20

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4R2 for RACE for mouse BSSP4 (reverse)

41/44

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4.1 for RACE  
for mouse BSSP4 (forward)

&lt;400&gt; 40

acaaaccatc tctgttctca g

21

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F2 for RACE  
for mouse BSSP4 (forward)

&lt;400&gt; 41

gtcccagaaa gtaggcattg

20

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F3 to amplify  
full-length mouse BSSP4-encoding mRNA (forward)

&lt;400&gt; 42

ctccacccat accagcaatg

20

40/44

&lt;400&gt; 37

agggcaatgt ctgcacaggc

20

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R3/E to  
amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (reverse)

&lt;400&gt; 38

ctgaattcct aggagcgcgc ggcggcc

27

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R4/E to  
amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (reverse)

&lt;400&gt; 39

gagaattcga tatgtgggca gggttaca

28

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence



<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F6 to amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (forward)

<400> 35

gccatggtgg tttctggagc

20

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R1 for RACE for human BSSP4 (reverse)

<400> 36

tatggtttgt tcaggttgtc c

21

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R2 for RACE for human BSSP4 (reverse)

38/44

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F1 for RACE  
for human BSSP4 (forward)

&lt;400&gt; 32

aggttcctat catcgactcg

20

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F2 for RACE  
for human BSSP4 (forward)

&lt;400&gt; 33

tgaggacatg ctgtgtgccg g

21

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F3 to amplify  
mature human BSSP4-encoding region (forward)

&lt;400&gt; 34

gttgtgggCG gcgaggacag

20

&lt;210&gt; 35

serin proteases-encoding sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> 9, 12

<223> n is a, c, g or t.

<400> 30

gtgctcacng cngcbcaytg

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of  
serin proteases-encoding sequence

<220>

<221> UNSURE

<222> 12, 15

<223> n is a, c, g or t.

<400> 31

ccvctrwsdc cncnggcga

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pTrypSigTag

<400> 28

gcacagtcga ggctgat

17

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pFBTrypSigTag

<400> 29

caaatgtggt atggctg

17

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of

35/44

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

&lt;400&gt; 25

gcgctagcag atctccatga atctactcct gatcc

35

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

&lt;400&gt; 26

tgaagcttgc catggaccaa cttgtcatc

29

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypHis

&lt;400&gt; 27

ccaagcttca ccatcaccat caccat

26

34/44

&lt;400&gt; 22

gaattcggat ccttgatc gtcgtcaaag ggggcagcaa cagcagcagc aacaaaggta 60

aggatcagga gtagattcat ggtgttgcta gccaaagctt 99

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding  
sequence

&lt;400&gt; 23

ttggtgcatg gcgga 15

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding  
sequence

&lt;400&gt; 24

tcctcgagac ttggcctgaa tggtttt 27

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

33/44

Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln  
 185 190 195 200  
 Val Asp Asp His Trp Leu Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys  
 205 210 215  
 Gly Ala Gln Pro Ala Arg Cys Val His Gln Pro Pro Ser Ser Pro Leu Leu  
 220 225 230  
 Gly Ala Lys Asp Arg Ser Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Leu Gly Gly Gln  
 235 240 245 250  
 Trp Gly His Arg Lys Leu Leu Ile  
 255

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

&lt;400&gt; 21

aagcttggct agcaacacca tgaatctact cctgatacctt acctttgttg ctgctgctgt 60  
 tgctgcccc tttgacgacg atgacaagga tccgaattc 99

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

32/44

&lt;400&gt; 20

Met Met Ile Ser Arg Pro Pro Pro Ala Leu Gly																			
												-45					-40		
Gly Asp Gln Phe Ser Ile Leu Ile Leu Leu Val Leu Leu Thr Ser Thr Ala																			
				-35					-30					-25					
Pro Ile Ser Ala Ala Thr Ile Arg Val Ser Pro Asp Cys Gly Lys Pro Gln																			
				-20					-15					-10					-5
Gln Leu Asn Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ser Met Asp Ala Gln Trp Pro																			
				-1	1					5					10				
Trp Ile Val Ser Ile Leu Lys Asn Gly Ser His His Cys Ala Gly Ser Leu																			
				15					20					25					30
Leu Thr Asn Arg Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Asn Met																			
				35					40					45					
Asp Lys Pro Ser Leu Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Lys Leu Gly Ser																			
				50					55					60					
Pro Gly Pro Arg Ser Gln Lys Val Gly Ile Ala Trp Val Leu Pro His Pro																			
				65					70					75					80
Arg Tyr Ser Trp Lys Glu Gly Thr His Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu																			
				85					90					95					
Glu His Ser Ile Gln Phe Ser Glu Arg Ile Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp																			
				100					105					110					115
Ser Ser Val Arg Leu Pro Pro Lys Thr Asp Cys Trp Ile Ala Gly Trp Gly																			
				120					125					130					
Ser Ile Gln Asp Gly Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu																			
				135					140					145					
Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Leu Cys Lys Ser Leu Tyr Trp Arg Gly																			
				150					155					160					165
Ala Gly Gln Glu Ala Ile Thr Glu Gly Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu																			
				170					175					180					



31/44

gcc ggt cag gaa gcc atc acg gag ggc atg ctg tgt gct ggt tac ctg gaa 775  
 Ala Gly Gln Glu Ala Ile Thr Glu Gly Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu  
 170 175 180  
 ggg gag cgg gat gct tgt ctg ggc gac tct ggg ggt ccc ctg atg tgc cag 826  
 Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln  
 185 190 195 200  
 gtg gat gac cac tgg cta ctg act ggc ata atc agc tgg gga gag ggc tgc 877  
 Val Asp Asp His Trp Leu Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys  
 205 210 215  
 gga gcg caa ccg gcc cgg tgt gta cac cag cct cct agc tca ccg ctc ctg 928  
 Gly Ala Gln Pro Ala Arg Cys Val His Gln Pro Pro Ser Ser Pro Leu Leu  
 220 225 230  
 ggt gca aag gat cgt tca agg ggt gca gct gcg cgg gta ctt ggc gga cag 979  
 Gly Ala Lys Asp Arg Ser Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Leu Gly Gly Gln  
 235 240 245 250  
 tgg gga cac agg aag ctc cta atc taggatctga agatgagcag cctcctgcaa 1033  
 Trp Gly His Arg Lys Leu Leu Ile  
 255  
 ttctctctgc tgtaaataatg tcttctacct ccggggggcg cccgcggcct gagcgagaga 1093  
 acaaggaagt tctggaaccg cccacataga ggatccgccc ctcaatcgag gactctgtgt 1153  
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgcct ctgtgtgcgt gtgtatgcgc gcgcacgtgc 1213  
 gcgcgagagc aatgatTTTT ttttttacag ttatacgtaa ccatgcccac atatttattc 1273  
 cagtttcaat aaattattta ttcttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1322  
  
 <210> 20  
 <211> 308  
 <212> PRT  
 <213> mouse

30/44

Gln Leu Asn Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ser Met Asp Ala Gln Trp Pro

-1 1 5 10

tgg att gtt agc atc ctc aag aat ggc tcc cac cac tgt gca ggc tcc ctg 316

Trp Ile Val Ser Ile Leu Lys Asn Gly Ser His His Cys Ala Gly Ser Leu

15 20 25 30

ctc acc aac cgc tgg gtg gtc aca gcc gcg cac tgc ttt aag agc aat atg 367

Leu Thr Asn Arg Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Asn Met

35 40 45

gac aaa cca tct ctg ttc tca gta ttg ttg ggg gcc tgg aag ctg ggg agc 418

Asp Lys Pro Ser Leu Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Lys Leu Gly Ser

50 55 60

cca ggc cca agg tcc cag aaa gta ggc att gct tgg gtg ctg cct cac ccc 469

Pro Gly Pro Arg Ser Gln Lys Val Gly Ile Ala Trp Val Leu Pro His Pro

65 70 75 80

agg tat tct tgg aag gag gga acc cat gca gac att gcc ctg gtg cgc ctg 520

Arg Tyr Ser Trp Lys Glu Gly Thr His Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu

85 90 95

gaa cac tcc atc cag ttc tct gag cgg atc ctg ccc atc tgc cta cct gac 571

Glu His Ser Ile Gln Phe Ser Glu Arg Ile Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp

100 105 110 115

tcc tct gtc cgt ctc cct ccc aag acc gac tgc tgg att gcc ggc tgg gga 622

Ser Ser Val Arg Leu Pro Pro Lys Thr Asp Cys Trp Ile Ala Gly Trp Gly

120 125 130

agc atc cag gat gga gtg ccc ctg ccc cac cct cag acc ctt cag aag ctg 673

Ser Ile Gln Asp Gly Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu

135 140 145

aag gtg ccc atc atc gac tcc gaa ctc tgc aaa agc ttg tac tgg cgg gga 724

Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Leu Cys Lys Ser Leu Tyr Trp Arg Gly

150 155 160 165

29/44

155                      160                      165                      170  
 Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala  
                          175                      180                      185  
 Cys Leu Val Ser Ser Leu Glu Pro Pro Thr Pro Gly Gln Glu Gly Leu Gly  
                          190                      195                      200                      205  
 Lys Glu Pro Ala Ser Val Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Thr Ser Pro Trp  
                          210                      215                      220  
 Pro Pro Pro Gln Asn Trp Leu Cys Leu Thr Val Pro Gly Pro His Arg Thr  
                          225                      230                      235  
 Ser Leu Ser Leu Ala Gln Pro Leu Thr Tyr Leu Phe Arg His  
 240                      245                      250

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1322

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 19

cctgccagtc tcaagcaaca cagcccttag gtcctttgag ccggccagca gccttgctgg 60  
 gtctccaccc ataccagca atg atg atc tcc aga cct ccc cca gca ctg ggt 112  
                          Met Met Ile Ser Arg Pro Pro Pro Ala Leu Gly  
    -45                      -40  
 ggg gac cag ttc agc atc tta atc ctt ctg gtg ctg ctg act tcc aca gct 163  
 Gly Asp Gln Phe Ser Ile Leu Ile Leu Leu Val Leu Leu Thr Ser Thr Ala  
                          -35                      -30                      -25  
 ccc atc agt gct gcc acc atc cga gtg tcc cca gac tgt ggg aag cct cag 214  
 Pro Ile Ser Ala Ala Thr Ile Arg Val Ser Pro Asp Cys Gly Lys Pro Gln  
                          -20                      -15                      -10                      -5  
 cag ctg aac cgg att gtg gga ggt gag gac agc atg gat gcc cag tgg ccc 265

&lt;212&gt; PRT

<213> human

<400> 18

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45                      -40                      -35

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30                      -25                      -20

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15                      -10                      -5                      -1      1

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

5                      10                      15

Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

20                      25                      30                      35

Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu

40                      45                      50

Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser

55                      60                      65

Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys

70                      75                      80                      85

Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln

90                      95                      100

Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu

105                      110                      115                      -                      120

Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly

125                      130                      135

Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile

140                      145                      150

Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro

27/44

105	110	115	120	
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561			
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly				
125	130	135		
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc	612			
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile				
140	145	150		
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc	663			
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro				
155	160	165	170	
atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct	714			
Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala				
175	180	185		
tgt ctg gtg agc tcc ctc gag ccc ccc acc cct ggc cag gag ggc ctc ggg	765			
Cys Leu Val Ser Ser Leu Glu Pro Pro Thr Pro Gly Gln Glu Gly Leu Gly				
190	195	200	205	
aag gag cca gcg tca gtc ctg tcc cca ctg agc ccc aca acc tct ccc tgg	816			
Lys Glu Pro Ala Ser Val Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Thr Ser Pro Trp				
210	215	220		
cct cct ccc cag aac tgg ctg tgc ctg aca gtc ccg ggt ccc cat aga acc	867			
Pro Pro Pro Gln Asn Trp Leu Cys Leu Thr Val Pro Gly Pro His Arg Thr				
225	230	235		
agc ctc agc ctg gct cag cca ctc act tat ttg ttc aga cat taaactgggc	919			
Ser Leu Ser Leu Ala Gln Pro Leu Thr Tyr Leu Phe Arg His				
240	245	250		
atcccagctg caaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	948			

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 302

26/44

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51  
 Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
 -45 -40 -35  
 acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102  
 Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
 -30 -25 -20  
 agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
 40 45 50  
 ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc 357  
 Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
 55 60 65  
 cag aaa gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag 408  
 Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys  
 70 75 80 - 85  
 gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag 459  
 Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln  
 90 95 100  
 ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc 510  
 Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu

25/44

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 129

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 16

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
-45 -40 -35  
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
-30 -25 -20  
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
-15 -10 -5 -1 1  
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
5 10 15  
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
20 25 30 35  
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Ser Leu Ala Pro Pro Ser Asp  
40 45 50  
Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Tyr His Arg Leu Gly Ser Leu Gln Pro Ser  
55 60 65  
Val Leu Ala Gly Ser Arg Thr Gly Thr His His  
70 75 80

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 948

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 17

24/44

agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gat tcc ctt gcc cca ccc tca gac 306  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Ser Leu Ala Pro Pro Ser Asp  
 40 45 50  
 cct gca gaa gct gaa ggt tcc tat cat cga ctc gga agt ctg cag cca tct 357  
 Pro Ala Glu Ala Glu Gly Ser Tyr His Arg Leu Gly Ser Leu Gln Pro Ser  
 55 60 65  
 gta ctg gcg ggg agc agg aca ggg acc cat cac ttaggacatg ctgtgtgccg 410  
 Val Leu Ala Gly Ser Arg Thr Gly Thr His His  
 70 75 80  
 gctacttggg gggggagcgg gatgcttgct tgggcgactc cgggggcccc ctcatgtgcc 470  
 aggtggacgg cgcttggtg ctggccggca tcatcagctg gggcgagggc tgtgccgagc 530  
 gcaacaggcc cggggtctac atcagcctct ctgcgcaccg ctcttggtg gagaagatcg 590  
 tgcaaggggt gcagctccgc gggcgcgctc aggggggtgg ggccctcagg gcaccgagcc 650  
 agggctctgg ggccgccg cgctcctagg gcgcagcggg acgcggggct cggatctgaa 710  
 aggcggccag atccacatct ggatctggat ctgcggcggc ctggggcggt tcccccgcc 770  
 gtaaataaggc tcatctacct ctacctctgg gggcccgagc ggctgtgcg gaaaggaaac 830  
 cccctccccg acccgcccga cggcctcagg ccccgccctc caaggcatca ggccccgcc 890  
 aacggcctca tgtccccgcc cccacgactt ccggccccgc cccggggccc cagcgctttt 950  
 gtgtatataa atgtaataa tttttatagg tatitgtaac cctgcccaca tate 1004



23/44

Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser

55

60

65

Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys

70

75

80

85

Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln

90

95

100

Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu

105

110

115

120

Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly

125

130

135

Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Ser Lys Ala Ser Gly Pro Ala Gln

140

145

150

Arg Pro His Val Pro Ala Pro Thr Thr Ser Gly Pro Ala Pro Gly Pro Ser

155

160

165

170

Ala Phe Val Tyr Ile Asn Val Asn Asp Phe Tyr Arg Tyr Leu

175

180

185

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1004

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 15

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc gcc 51

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

22/44

gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctc tcc aag gca tca ggc ccc gcc caa 612  
 Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Ser Lys Ala Ser Gly Pro Ala Gln

140

145

150

cgg cct cat gtc ccc gcc ccc acg act tcc ggc ccc gcc ccg ggc ccc agc 663  
 Arg Pro His Val Pro Ala Pro Thr Thr Ser Gly Pro Ala Pro Gly Pro Ser

155

160

165

170

gct ttt gtg tat ata aat gtt aat gat ttt tat agg tat ttg taaccctgcc 715  
 Ala Phe Val Tyr Ile Asn Val Asn Asp Phe Tyr Arg Tyr Leu

175

180

185

cacatatac

723

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 234

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 14

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15

-10

-5

-1 1

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

5

10

15

Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

20

25

30

35

Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu

40

45

50

21/44

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
 -30 -25 -20  
 agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
 40 45 50  
 ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc 357  
 Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
 55 60 65  
 cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag 408  
 Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys  
 70 75 80 85  
 gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag 459  
 Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln  
 90 95 100  
 ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc 510  
 Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu  
 105 110 115 120  
 cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga 561  
 Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly  
 125 130 135

<400> 12

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 723

## <212> DNA

<213> human

<400> 13

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51  
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
-45 -40 -35  
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102

19/44

cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
 40 45 50  
 ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc 357  
 Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
 55 60 65  
 cag aag ttc cct tgc ccc acc ctc aga ccc tgc aga agc tgaaggttcc 406  
 Gln Lys Phe Pro Cys Pro Thr Leu Arg Pro Cys Arg Ser  
 70 75 80  
 tatcatcgac tcggaagtct gcagccatct gtactggcgg ggagcaggac agggacccat 466  
 cactgaggac atgctgtgtg ccggctactt ggagggggag cgggatgctt gtctgggcga 526  
 ctccgggggc cccctcatgt gccaggtgga cggcgcctgg ctgctggccg gcatcatcag 586  
 ctggggcgag ggctgtgccg agcgcaacag gcccggggtc tacatcagcc tctctgcgca 646  
 ccgctcctgg gtggagaaga tcgtgcaagg ggtgcagctc cgcgggcgcg ctcagggggg 706  
 tggggccctc agggcaccga gccagggtc tggggccgcc gcgcgtcct agggcgcagc 766  
 gggacgcggg gctcggtatct gaaaggcggc cagatccaca tctggatctg gatctgcggc 826  
 ggccctgggc ggtttccccc gccgtaaata ggctcatcta cctctacctc tgggggcccc 886  
 gacggctgct gcggaaagga aacccccctc ccgaccgcc cgacggcctc agggccccgcc 946  
 ctccaaggca tcaggccccg cccaacggcc tcatgtcccc gccccacga cttccggccc 1006  
 cgccccggg cccagcgct tttgtgtata taaatgttaa tgatttttat aggtatttgt 1066  
 aaccctgccc acatatac - 1083

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 131

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

18/44

Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp  
                   90                                  95                                  100  
 Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser  
                   105                                  110                                  115                                  120  
 Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly  
                                   125                                  130                                  135  
 Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala  
                   140                                  145                                  150  
 Ala Ala Arg Ser  
 155

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 1083

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 11

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51  
           Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
                                   -45                                  -40                                  -35  
 acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102  
           Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
                                   -30                                  -25                                  -20  
 agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153  
           Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
                                   -15                                  -10                                  -5                                  -1 1  
 gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
           Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

5

10

15

17/44

155

ccagatccac atctggatct ggatctgcgg cggcctcggg cggtttcccc cgccgtaaatt 724  
 aggctcatct acctctacct ctggggggccc ggacgggtgc tgcggaaagg aaaccccctc 784  
 cccgaccgc cgcacggcct caggccccgc cctccaaggc atcaggcccc gcccaacggc 844  
 ctcatgtccc cgccccacg acttccggcc ccgccccggg gccccagcgc ttttgtgtat 904  
 ataaatgtta atgattttta taggtatttg taaccctgcc cacatatc 952

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 207

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 10

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly  
 -45 -40 -35  
 Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala  
 -30 -25 -20  
 Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr  
 20 25 30 35  
 Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu  
 40 45 50  
 Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala  
 55 60 65  
 Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
 70 75 80 85

16/44

gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
                   5                                  10                                  15  
 cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc 255  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr  
                   20                                  25                                  30                                  35  
 ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc gac tgc gaa gtc tgc agc cat ctg 306  
 Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu  
                                   40                                  45                                  50  
 tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc atc act gag gac atg ctg tgt gcc 357  
 Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala  
                                   55                                  60                                  65  
 ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc 408  
 Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro  
                   70                                  75                                  80                                  85  
 ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg 459  
 Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp  
                                   90                                  95                                  100  
 ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct 510  
 Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser  
                   105                                  110                                  115                                  120  
 gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg 561  
 Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly  
                                   125                                  130                                  135  
 cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc 612  
 Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala  
                   140                                  145                                  150  
 gcc gcg cgc tcc tagggcgcag cgggacgcgg ggctcggatc tgaaaggcgg 664  
 Ala Ala Arg Ser



15/44

-15	-10	-5	-1	1
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile				
5	10	15		
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Gln Pro Glu Gln Thr Ile Pro				
20	25	30	35	
Val Leu Cys Ala Ala Gly Gly Leu Ala Ala Gly Glu Pro Trp Leu Ser Val				
40	45	50		
Pro Glu Gly Gly Cys Cys Leu Gly Gly Ala Pro Pro Cys Val Phe Leu Glu				
55	60	65		
Gly Arg Cys Leu Cys Arg His Cys Pro Gly Ala Ser Arg Ala Leu His Thr				
70	75	80	85	
Val Leu Arg Ala Gly Pro Ala His Leu Pro Thr				
90	95			

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 952

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 9

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc	51			
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly				
-45	-40	-35		
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc	102			
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala				
-30	-25	-20		
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt	153			
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val				
-15	-10	-5	-1	1

14/44

70	75	80	85	
gtt ctc aga gcg ggt cct gcc cat ctg cct acc tgatgcctct	atccacctcc	461		
Val Leu Arg Ala Gly Pro Ala His Leu Pro Thr				
90	95			
ctccaaacac ccactgctgg atctcaggct gggggagcat ccaagatgga gttcccttgc	521			
cccacctca gacctgcag aagctgaagg ttctatcat cgactcgga gttctgcagcc	581			
atctgtactg gcggggagca ggacaggac ccatcactga ggacatgctg tgtgccggct	641			
acttggaggg ggagcgggat gcttgtctgg gcgactccgg gggccccctc atgtgccagg	701			
tggacggcgc ctggctgctg gccggcatca tcagctgggg cgagggtgt gccgagcgca	761			
acaggcccgg ggtctacatc agcctctctg cgcaccgctc ctgggtggag aagatcgtgc	821			
aaggggtgca gctccgagg cgcgctcagg ggggtggggc cctcaggga ccgagccagg	881			
gctctggggc cgccgcgcgc tctagggcg cagcgggacg cggggtcgg atctgaaagg	941			
cggccagatc cacatctgga tctggatctg cggcggcctc gggcggtttc ccccgccgta	1001			
aataggetca tctacctta cctctggggg ccgggacggc tgctgcgga aggaaacccc	1061			
ctccccgacc cgccgacgg cctcaggccc cgccctcaa ggcatcaggc cccgcccac	1121			
ggcctcatgt ccccgcccc acgacttccg gccccgcccc cgggccccag cgcttttgtg	1181			
tatataaatg ttaatgatt ttataggtat ttgtaaccct gccacatat c	1232			

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 146

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 8

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

13/44

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 1232

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 7

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51
Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
      -45          -40          -35
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102
Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
      -30          -25          -20
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153
Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
      -15          -10          -5          -1 1
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204
Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
      5          10          15
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca gga caa cct gaa caa acc ata cct 255
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Gln Pro Glu Gln Thr Ile Pro
      20          25          30          35
gtt ctc tgt gct gct ggg ggc ctg gca gct ggg gaa ccc tgg ctc tcg gtc 306
Val Leu Cys Ala Ala Gly Gly Leu Ala Ala Gly Glu Pro Trp Leu Ser Val
      40          45          50
cca gaa ggt ggg tgt tgc ctg ggt gga gcc cca ccc tgt gta ttc ctg gaa 357
Pro Glu Gly Gly Cys Cys Leu Gly Gly Ala Pro Pro Cys Val Phe Leu Glu
      55          60          65
gga agg tgc ctg tgc aga cat tgc cct ggt gcg tct cga gcg ctc cat aca 408
Gly Arg Cys Leu Cys Arg His Cys Pro Gly Ala Ser Arg Ala Leu His Thr

```

12/44

20	25	30	35
Val	Ile	Thr	Ala
Ala	His	Cys	Phe
Lys	Asp	Asn	Leu
Asn	Lys	Pro	Tyr
Leu			
40	45	50	
Phe	Ser	Val	Leu
Leu	Gly	Ala	Trp
Gln	Leu	Gly	Asn
Pro	Gly	Ser	Arg
Ser			
55	60	65	
Gln	Lys	Val	Gly
Val	Ala	Trp	Val
Glu	Pro	His	Pro
Val	Tyr	Ser	Trp
Lys			
70	75	80	85
Glu	Gly	Ala	Cys
Ala	Asp	Ile	Ala
Leu	Val	Arg	Leu
Glu	Arg	Ser	Ile
Gln			
90	95	100	
Phe	Ser	Glu	Arg
Val	Leu	Pro	Ile
Cys	Leu	Pro	Asp
Ala	Ser	Ile	His
Leu			
105	110	115	120
Pro	Pro	Asn	Thr
His	Cys	Trp	Ile
Ser	Gly	Trp	Gly
Ser	Ile	Gln	Asp
Gly			
125	130	135	
Val	Pro	Leu	Pro
His	Pro	Gln	Thr
Leu	Gln	Lys	Leu
Lys	Val	Pro	Ile
Ile			
140	145	150	
Asp	Ser	Glu	Val
Cys	Ser	His	Leu
Tyr	Trp	Arg	Gly
Ala	Gly	Gln	Gly
Pro			
155	160	165	170
Ile	Thr	Glu	Asp
Met	Leu	Cys	Ala
Gly	Tyr	Leu	Glu
Gly	Glu	Arg	Asp
Ala			
175	180	185	
Cys	Leu	Gly	Asp
Ser	Gly	Gly	Pro
Leu	Met	Cys	Gln
Val	Asp	Gly	Ala
Trp			
190	195	200	205
Leu	Leu	Ala	Gly
Ile	Ile	Ser	Trp
Gly	Glu	Gly	Cys
Ala	Glu	Arg	Asn
Arg			
210	215	220	
Pro	Gly	Val	Tyr
Ile	Ser	Leu	Ser
Ala	His	Arg	Ser
Trp	Val	Glu	Lys
Ile			
225	230	235	
Val	Gln	Gly	Val
Gln	Leu	Arg	Gly
Arg	Pro	Arg	Ala
Pro	Ile	Leu	Leu
Cys			
240	245	250	255
Ile			

11/44

Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg

210

215

220

ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc 867

Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile

225

230

235

gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc ccc cgg gcc cca gcg ctt ttg tgt 918

Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Pro Arg Ala Pro Ala Leu Leu Cys

240

245

250

255

ata taaatgttaa tgatttttat aggtatttgt aacctgccc acatatctta 971

Ile

tttattcctc caatttcaat aaattattta ttctccagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1031

aaaaa

1036

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 306

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 6

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val

-15

-10

-5

-1 1

Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile

5

10

15

Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp

10/44

40	45	50	
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc			357
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser			
55	60	65	
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag			408
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys			
70	75	80	85
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag			459
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln			
90	95	100	
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc			510
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu			
105	110	115	120
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga			561
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly			
125	130	135	
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc			612
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile			
140	145	150	
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc			663
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro			
155	160	165	170
atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct			714
Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala			
175	180	185	
tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg			765
Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp			
190	195	200	205
ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg			816

9/44

225	230	235	
Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg			
240	245	250	255
Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ile			
260	265	270	

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 1036

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 5

```

gcc atg gtg gtt tct gga gcg ccc cca gcc ctg ggt ggg ggc tgt ctc ggc 51
    Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly
          -45          -40          -35
acc ttc acc tcc ctg ctg ctg ctg gcg tcg aca gcc atc ctc aat gcg gcc 102
    Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala
          -30          -25          -20
agg ata cct gtt ccc cca gcc tgt ggg aag ccc cag cag ctg aac cgg gtt 153
    Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val
          -15          -10          -5          -1 1
gtg ggc ggc gag gac agc act gac agc gag tgg ccc tgg atc gtg agc atc 204
    Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile
          5          10          15
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg 255
    Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp
          20          25          30          35
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg 306
    Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu

```

8/44

Arg Ile Pro Val Pro Pro Ala Cys Gly Lys Pro Gln Gln Leu Asn Arg Val  
 -15 -10 -5 -1 1  
 Val Gly Gly Glu Asp Ser Thr Asp Ser Glu Trp Pro Trp Ile Val Ser Ile  
 5 10 15  
 Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp  
 20 25 30 35  
 Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu  
 40 45 50  
 Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser  
 55 60 65  
 Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys  
 70 75 80 85  
 Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln  
 90 95 100  
 Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu  
 105 110 115 120  
 Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly  
 125 130 135  
 Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile  
 140 145 150  
 Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro  
 155 160 165 170  
 Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala  
 175 180 185  
 Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp  
 190 195 200 205  
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg  
 210 215 220  
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile



7/44

Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala  
 175 180 185  
 tgt ctg ggc gac tcc ggg ggc ccc ctc atg tgc cag gtg gac ggc gcc tgg 765  
 Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln Val Asp Gly Ala Trp  
 190 195 200 205  
 ctg ctg gcc ggc atc atc agc tgg ggc gag ggc tgt gcc gag cgc aac agg 816  
 Leu Leu Ala Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Glu Arg Asn Arg  
 210 215 220  
 ccc ggg gtc tac atc agc ctc tct gcg cac cgc tcc tgg gtg gag aag atc 867  
 Pro Gly Val Tyr Ile Ser Leu Ser Ala His Arg Ser Trp Val Glu Lys Ile  
 225 230 235  
 gtg caa ggg gtg cag ctc cgc ggg cgc gct cag ggg ggt ggg gcc ctc agg 918  
 Val Gln Gly Val Gln Leu Arg Gly Arg Ala Gln Gly Gly Gly Ala Leu Arg  
 240 245 250 255  
 gca ccg agc cag ggc tct ggg gcc cca gcg ctt ttg tgt ata taaatgttaa 970  
 Ala Pro Ser Gln Gly Ser Gly Ala Pro Ala Leu Leu Cys Ile  
 260 265 270  
 tgatttttat aggtatttgt aaccctgccc acatatc 1007

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 319

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 4

Met Val Val Ser Gly Ala Pro Pro Ala Leu Gly Gly Gly Cys Leu Gly

-45

-40

-35

Thr Phe Thr Ser Leu Leu Leu Leu Ala Ser Thr Ala Ile Leu Asn Ala Ala

-30

-25

-20

6/44

5	10	15	
cag aag aat ggg acc cac cac tgc gca ggt tct ctg ctc acc agc cgc tgg	255		
Gln Lys Asn Gly Thr His His Cys Ala Gly Ser Leu Leu Thr Ser Arg Trp			
20	25	30	35
gtg atc act gct gcc cac tgt ttc aag gac aac ctg aac aaa cca tac ctg	306		
Val Ile Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Asp Asn Leu Asn Lys Pro Tyr Leu			
40	45	50	
ttc tct gtg ctg ctg ggg gcc tgg cag ctg ggg aac cct ggc tct cgg tcc	357		
Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Gln Leu Gly Asn Pro Gly Ser Arg Ser			
55	60	65	
cag aag gtg ggt gtt gcc tgg gtg gag ccc cac cct gtg tat tcc tgg aag	408		
Gln Lys Val Gly Val Ala Trp Val Glu Pro His Pro Val Tyr Ser Trp Lys			
70	75	80	85
gaa ggt gcc tgt gca gac att gcc ctg gtg cgt ctc gag cgc tcc ata cag	459		
Glu Gly Ala Cys Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu Glu Arg Ser Ile Gln			
90	95	100	
ttc tca gag cgg gtc ctg ccc atc tgc cta cct gat gcc tct atc cac ctc	510		
Phe Ser Glu Arg Val Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser Ile His Leu			
105	110	115	120
cct cca aac acc cac tgc tgg atc tca ggc tgg ggg agc atc caa gat gga	561		
Pro Pro Asn Thr His Cys Trp Ile Ser Gly Trp Gly Ser Ile Gln Asp Gly			
125	130	135	
gtt ccc ttg ccc cac cct cag acc ctg cag aag ctg aag gtt cct atc atc	612		
Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu Lys Val Pro Ile Ile			
140	145	150	
gac tcg gaa gtc tgc agc cat ctg tac tgg cgg gga gca gga cag gga ccc	663		
Asp Ser Glu Val Cys Ser His Leu Tyr Trp Arg Gly Ala Gly Gln Gly Pro			
155	160	165	170
atc act gag gac atg ctg tgt gcc ggc tac ttg gag ggg gag cgg gat gct	714		

29/44

155                      160                      165                      170  
 Ile Thr Glu Asp Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Glu Arg Asp Ala  
                          175                      180                      185  
 Cys Leu Val Ser Ser Leu Glu Pro Pro Thr Pro Gly Gln Glu Gly Leu Gly  
                          190                      195                      200                      205  
 Lys Glu Pro Ala Ser Val Leu Ser Pro Leu Ser Pro Thr Thr Ser Pro Trp  
                          210                      215                      220  
 Pro Pro Pro Gln Asn Trp Leu Cys Leu Thr Val Pro Gly Pro His Arg Thr  
                          225                      230                      235  
 Ser Leu Ser Leu Ala Gln Pro Leu Thr Tyr Leu Phe Arg His  
 240                      245                      250

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 1322

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 19

cctgccagtc tcaagcaaca cagcccttag gtcctttgag ccggccagca gccttgctgg 60

gctccaccc ataccagca atg atg atc tcc aga cct ccc cca gca ctg ggt 112

Met Met Ile Ser Arg Pro Pro Pro Ala Leu Gly

-45

-40

ggg gac cag ttc agc atc tta atc ctt ctg gtg ctg ctg act tcc aca gct 163

Gly Asp Gln Phe Ser Ile Leu Ile Leu Val Leu Leu-Thr Ser Thr Ala

-35

-30

-25

ccc atc agt gct gcc acc atc cga gtg tcc cca gac tgt ggg aag cct cag 214

Pro Ile Ser Ala Ala Thr Ile Arg Val Ser Pro Asp Cys Gly Lys Pro Gln

-20

-15

-10

-5

cag ctg aac cgg att gtg gga ggt gag gac agc atg gat gcc cag tgg ccc 265

30/44

Gln Leu Asn Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ser Met Asp Ala Gln Trp Pro  
                   -1   1                                  5                                  10  
 tgg att gtt agc atc ctc aag aat ggc tcc cac cac tgt gca ggc tcc ctg 316  
 Trp Ile Val Ser Ile Leu Lys Asn Gly Ser His His Cys Ala Gly Ser Leu  
                   15                                  20                                  25                                  30  
 ctc acc aac cgc tgg gtg gtc aca gcc gcg cac tgc ttt aag agc aat atg 367  
 Leu Thr Asn Arg Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Asn Met  
                                   35                                  40                                  45  
 gac aaa cca tct ctg ttc tca gta ttg ttg ggg gcc tgg aag ctg ggg agc 418  
 Asp Lys Pro Ser Leu Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Lys Leu Gly Ser  
                                   50                                  55                                  60  
 cca ggc cca agg tcc cag aaa gta ggc att gct tgg gtg ctg cct cac ccc 469  
 Pro Gly Pro Arg Ser Gln Lys Val Gly Ile Ala Trp Val Leu Pro His Pro  
                   65                                  70                                  75                                  80  
 agg tat tct tgg aag gag gga acc cat gca gac att gcc ctg gtg cgc ctg 520  
 Arg Tyr Ser Trp Lys Glu Gly Thr His Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu  
                                   85                                  90                                  95  
 gaa cac tcc atc cag ttc tct gag cgg atc ctg ccc atc tgc cta cct gac 571  
 Glu His Ser Ile Gln Phe Ser Glu Arg Ile Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp  
                   100                                  105                                  110                                  115  
 tcc tct gtc cgt ctc cct ccc aag acc gac tgc tgg att gcc ggc tgg gga 622  
 Ser Ser Val Arg Leu Pro Pro Lys Thr Asp Cys Trp Ile Ala Gly Trp Gly  
                                   120                                  125                                  130  
 agc atc cag gat gga gtg ccc ctg ccc cac cct cag acc ctt cag aag ctg 673  
 Ser Ile Gln Asp Gly Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu  
                   135                                  140                                  145  
 aag gtg ccc atc atc gac tcc gaa ctc tgc aaa agc ttg tac tgg cgg gga 724  
 Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Leu Cys Lys Ser Leu Tyr Trp Arg Gly  
                   150                                  155                                  160                                  165

WO 00/31277

31/44

gcc ggt cag gaa gcc atc acg gag ggc atg ctg tgt gct ggt tac ctg gaa 775  
 Ala Gly Gln Glu Ala Ile Thr Glu Gly Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu  
 170 175 180

ggg gag cgg gat gct tgt ctg ggc gac tct ggg ggt ccc ctg atg tgc cag 826  
 Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln  
 185 190 195 200

gtg gat gac cac tgg cta ctg act ggc ata atc agc tgg gga gag ggc tgc 877  
 Val Asp Asp His Trp Leu Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys  
 205 210 215

gga gcg caa ccg gcc cgg tgt gta cac cag cct cct agc tca ccg ctc ctg 928  
 Gly Ala Gln Pro Ala Arg Cys Val His Gln Pro Pro Ser Ser Pro Leu Leu  
 220 225 230

ggt gca aag gat cgt tca agg ggt gca gct gcg cgg gta ctt ggc gga cag 979  
 Gly Ala Lys Asp Arg Ser Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Leu Gly Gly Gln  
 235 240 245 250

tgg gga cac agg aag ctc cta atc taggatctga agatgagcag cctcctgcaa 1033  
 Trp Gly His Arg Lys Leu Leu Ile  
 255

ttctctctgc tgtaaatacg tcttctacct ccggggggcg cccgcggcct gagcgagaga 1093  
 acaaggaagt tctggaaccg cccacataga ggatccgccc ctcaatcgag gactctgtgt 1153  
 gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgcct ctgtgtgcgt gtgtatgcgc gcgcacgtgc 1213  
 gcgcgagagc aatgattttt ttttttacag ttatacgtaa ccatgcccac atattttatc 1273  
 cagtttcaat aaattattta tttttaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1322

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 308

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; mouse

&lt;400&gt; 20

Met Met Ile Ser Arg Pro Pro Pro Ala Leu Gly  
-45  
Gly Asp Gln Phe Ser Ile Leu Ile Leu Val Leu Leu Thr Ser Thr Ala  
-40  
-35  
Pro Ile Ser Ala Ala Thr Ile Arg Val Ser Pro Asp Cys Gly Lys Pro Gln  
-30  
-25  
-20  
Gln Leu Asn Arg Ile Val Gly Gly Glu Asp Ser Met Asp Ala Gln Trp Pro  
-15  
-10  
-5  
-1 1 5 10  
Trp Ile Val Ser Ile Leu Lys Asn Gly Ser His His Cys Ala Gly Ser Leu  
15 20 25 30  
Leu Thr Asn Arg Trp Val Val Thr Ala Ala His Cys Phe Lys Ser Asn Met  
35 40 45  
Asp Lys Pro Ser Leu Phe Ser Val Leu Leu Gly Ala Trp Lys Leu Gly Ser  
50 55 60  
Pro Gly Pro Arg Ser Gln Lys Val Gly Ile Ala Trp Val Leu Pro His Pro  
65 70 75 80  
Arg Tyr Ser Trp Lys Glu Gly Thr His Ala Asp Ile Ala Leu Val Arg Leu  
85 90 95  
Glu His Ser Ile Gln Phe Ser Glu Arg Ile Leu Pro Ile Cys Leu Pro Asp  
100 105 110 115  
Ser Ser Val Arg Leu Pro Pro Lys Thr Asp Cys Trp Ile Ala Gly Trp Gly  
120 125 130  
Ser Ile Gln Asp Gly Val Pro Leu Pro His Pro Gln Thr Leu Gln Lys Leu  
135 140 145  
Lys Val Pro Ile Ile Asp Ser Glu Leu Cys Lys Ser Leu Tyr Trp Arg Gly  
150 155 160 165  
Ala Gly Gln Glu Ala Ile Thr Glu Gly Met Leu Cys Ala Gly Tyr Leu Glu  
170 175 180

33/44

Gly Glu Arg Asp Ala Cys Leu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Met Cys Gln

185

190

195

200

Val Asp Asp His Trp Leu Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Gly Cys

205

210

215

Gly Ala Gln Pro Ala Arg Cys Val His Gln Pro Pro Ser Ser Pro Leu Leu

220

225

230

Gly Ala Lys Asp Arg Ser Arg Gly Ala Ala Ala Arg Val Leu Gly Gly Gln

235

240

245

250

Trp Gly His Arg Lys Leu Leu Ile

255

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

&lt;400&gt; 21

aagcttggt agcaacacca tgaatctact cctgacctt accttgttg ctgctgctgt 60

tgctgcccc ttgacgacg atgacaagga tccgaattc 99

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 99

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide to construct plasmid pSecTrypHis

34/44

&lt;400&gt; 22

gaattcggat ccttgatc gtcgtcaaag ggggcagcaa cagcagcagc aacaaaggta 60  
aggatcagga gtagattcat ggtgttgcta gccaaagctt 99

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding  
sequence

&lt;400&gt; 23

ttggtgcatg gcgga 15

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify neurosin-encoding  
sequence

&lt;400&gt; 24

tcctcgagac ttggcctgaa tggtttt 27

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA



35/44

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

&lt;400&gt; 25

gcgctagcag atctccatga atctactcct gatcc

35

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pSecTrypHis/Neurosin

&lt;400&gt; 26

tgaagcttgc catggaccaa cttgtcatc

29

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypHis

&lt;400&gt; 27

ccaagcttca ccatcaccat caccat

26

<210> 28

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pTrypSigTag

<400> 28

gcacagtcga ggctgat

17

<210> 29

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid  
pFBTrypSigTag

<400> 29

caaatgtggt atggctg

17

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of

37/44

serin proteases-encoding sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; 9, 12

&lt;223&gt; n is a, c, g or t.

&lt;400&gt; 30

gtgctcacng cngcbcaytg

20

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify conserved region of  
serin proteases-encoding sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; UNSURE

&lt;222&gt; 12, 15

&lt;223&gt; n is a, c, g or t.

&lt;400&gt; 31

ccvctrwsdc cncnggcga

20

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

38/44

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F1 for RACE  
for human BSSP4 (forward)

<400> 32

aggttcctat catcgactcg

20

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F2 for RACE  
for human BSSP4 (forward)

<400> 33

tgaggacatg ctgtgtgccg g

21

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F3 to amplify  
mature human BSSP4-encoding region (forward)

<400> 34

gttgtgggcg gcgaggacag

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4F6 to amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (forward)

<400> 35

gccatggtgg tttctggagc

20

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R1 for RACE for human BSSP4 (reverse)

<400> 36

tatggtttgt tcaggttgc c

21

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R2 for RACE for human BSSP4 (reverse)

40/44

&lt;400&gt; 37

agggcaatgt ctgcacaggc

20

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R3/E to  
amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (reverse)

&lt;400&gt; 38

ctgaattcct aggagcgcgc ggcggcc

27

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as hBSSP4R4/E to  
amplify full-length human BSSP4-encoding mRNA (reverse)

&lt;400&gt; 39

gagaattcga tatgtgggca gggttaca

28

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

41/44

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4.1 for RACE  
for mouse BSSP4 (forward)

&lt;400&gt; 40

acaaaccatc tctgttctca g

21

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F2 for RACE  
for mouse BSSP4 (forward)

&lt;400&gt; 41

gtcccagaaa gtaggcattg

20

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F3 to amplify  
full-length mouse BSSP4-encoding mRNA (forward)

&lt;400&gt; 42

ctccacccat accagcaatg

20

42/44

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4F4 to amplify  
mature mouse BSSP4-encoding region (forward)

&lt;400&gt; 43

attgtgggag gtgaggacag

20

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4.2 for RACE  
for mouse BSSP4 (reverse)

&lt;400&gt; 44

tgcagagttc ggagtcgatg

20

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4R2 for RACE  
for mouse BSSP4 (reverse)



&lt;400&gt; 45

atccagcagt cggctcttggg

20

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Designed oligonucleotide primer designated as mBSSP4R3/P to  
amplify full-length mouse BSSP4-encoding mRNA (reverse)

&lt;400&gt; 46

attctgcagt tccttgttct ctcgctcagg

30

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

&lt;400&gt; 47

AAGCTTGGCT AGCAACACCA TGAATCTACT CCTGATCCTT ACCTTTGTTG CTGCTGCTGT 60

TGCTGCCCCC TTTCACCATC ACCATCACCA TGACGACGAT GACAAGGATC CGAATTC 117

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide to construct plasmid pTrypHis

<400> 48

GAATTCGGAT CCTTGCATC GTCGTCATGG TGATGGTGAT GGTGAAAGGG GGCAGCAACA 60

GCAGCAGCAA CAAAGGTAAG GATCAGGAGT AGATTCATGG TGTTGCTAGC CAAGCTT 117

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06472

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/57, C12N 9/50, C07K 14/47, C12P 21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N 15/57, C12N 9/50, C07K 14/47, C12P 21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N 33/53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO, 98/36054, A1 (AMRAD OPERATIONS PTY.LTD.), 20 August, 1998 (20.08.98) (Family: none)	1-18, 23, 24, 29-59, 64-75 /60-63
Y	EP, 828003, A (SmithKline Beecham PLC.), 11 March, 1998 (11.03.98) & JP, 10-117789, A	60-62
Y	JP, 10-146188, A (Eijin Kenkyusho K.K.), 02 June, 1998 (02.06.98) (Family: none)	63
PX	WO, 99/35170, A2 (Genentech INC.), 15 July, 1999 (15.07.99) (Family: none)	1-75
PX	WO, 99/14328, A2 (Genentech INC.), 25 March, 1999 (25.03.99) (Family: none)	1-75



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
"E" earlier document but published on or after the international filing date  
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
27 January, 2000 (27.01.00)

Date of mailing of the international search report  
08 February, 2000 (08.02.00)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06472

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Inventions as set forth in claims are classified into the following groups:

- claims 1 to 18, 23, 24, 29 to 54 (55 to 59), (64 to 75): sequences containing matured proteins or parts thereof;
- claims 19, 20, 25, 26 (55 to 59), (64 to 75): presequences;
- claims 21, 22, 27, 28 (55 to 59), (64 to 75): prosequences;
- claims 60 to 62: transgenic animals; and
- claim 63: a knockout mouse.

These groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06472

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/57, C12N 9/50, C07K 14/47, C12P 21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N 33/53

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N 15/57, C12N 9/50, C07K 14/47, C12P 21/02, A01K 67/027, C07K 16/40, G01N 33/53

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	WO, 98/36054, A1 (AMRAD OPERATIONS PTY. LTD.) 20. 8月. 1998 (20. 08. 98) ファミリーなし	1-18, 23, 24, 29-59, 64-75 /60-63
Y	EP, 828003, A (SmithKline Beecham PLC.) 11. 3月. 1998 (11. 03. 98) & JP, 10-117789, A	60-62
Y	JP, 10-146188, A (株式会社エイジーン研究所) 2. 6月. 1998 (02. 06. 98) ファミリーなし	63

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 01. 00

国際調査報告の発送日

08.02.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	WO, 99/35170, A2 (Genentech INC.) 15. 7月. 1999 (15. 07. 99) ファミリーなし	1 - 7 5
P X	WO, 99/14328, A2 (Genentech INC.) 25. 3月. 1999 (25. 03. 99) ファミリーなし	1 - 7 5

國際出願番号 PCT/JP99/06472

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって P C T 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

